الطرق الحديثة لتحليل

الأحماض الأمينية

وتقييم نوعية البروتين



دكتور

رضوان صدقى فرج











المكتبة الأكاديمية
شركة مساهمة مصرية
الحاصلة على شهادة الجودة
ISO 9002
Certificate No.: 82210
03/05/2001

الطرق الحديثة لتحليل

الأحماض الأمينية

وتقييم نوعية البروتين

الطرق الحديثة لتحليل
الأحماض الأمينية
وتقييم نوعية البروتين

تأليف
دكتور
رضوان صدقي فرج محمد
أستاذ الكيمياء الحيوية
كلية الزراعة – جامعة القاهرة



الناشر
المكتبة الأكاديمية
شركة مساهمة مصرية
٢٠٠٤

حقوق النشر

الطبعة الأولى ٢٠٠٤م - ١٤٢٤هـ

المكتبـــة الأكاديميـــة

شركة مساهمة مصرية

رأس المال المصدر والمدفوع ٩,٩٧٣,٨٠٠ جنيه مصرى

١٢١ شارع التحرير – الدقى – الجيزة

القاهرة - جمهورية مصر العربية

تليفون : ٧٤٨٥٢٨٢ - ٣٣٦٨٢٨٨ (٢٠٢)

فاكس : ٧٤٩١٨٩٠ (٢٠٢)

إهداء

إلى أسرتى الغالية

وفاءً وإعترافاً بفضلها وتضحيتها بوقتها

لاتمام تأليف هذا الكتاب

مقدمـــة

يعتبر الحمض الأمينى الوحدة الأساسية لتكوين البروتينات والببتيدات ومن المعروف أن البروتينات من ضمن المواد النباتية الأساسية التى تدخل فى تركيب مركبات عديدة ذات وظائف فسيولوجية مهمة جداً للانسان وباقى الكائنات الحية وتعتبر الحياة مستحيلة بدون البروتينات بالاضافة إلى ذلك، نوعية الأحماض الأمينية التى لها دور هام فى مجال التغذية وتحديد القيمة الغذائية للأطعمة كما أن التمثيل الغذائى غير السليم للأحماض الأمينية يؤدى إلى حدوث أمراض وراثية خطيرة. ومن هذا يتبين مدى أهمية التعرف وصفيا وكميا على أنواع الأحماض الأمينية.

تتطلب بعض الكائنات الحية مثل الإنسان والحيوان أنواع معينة من الأحماض الأمينية لا يستطيع تخليقها داخل أنسجتها وقد أطلق عليها الأحماض الأمينية الأساسية (الضرورية) والتى لابد أن نتناولها فى الغذاء. على ذلك، يجب ان تحتوى الوجبات الغذائية المتزنة على جميع هذه الأحماض الأساسية بتركيزات مناسبة. ومما هو جدير بالذكر، أن النبات فقط من بين الكائنات الحية الذى يستطيع تخليق الأحماض الأمينية الأساسية، وكذلك تستطيع بعض الثدييات أيضا تخليق عدد محدود من تلك الأحماض الأمينية.

ونظرا لانتشار الأحماض الأمينية بأنواعها المختلفة وبكميات متباينة بين الكائنات الحية، فانه توجد ثلاث قطاعات أساسية تهتم بتقدير الأحماض الأمينية وهى الطبية والصناعية والبحثية. فمن الناحية الطبية تدخل الأحماض الأمينية فى مجالات الأغراض التشخيصية وتنظيم الغذاء ومن الناحية الصناعية فهى تدخل فى مراقبة الجودة ومن الناحية البحثية وهى التى تجرى فى الجامعات والمعاهد العلمية فان دراسة الأحماض تخدم فروع العلوم المختلفة مثل: الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية والميكروبيولوجيا والمعامل المركزية الخدمية.

ويتعرض هذا الكتاب إلى المشاكل التى تحدث أثناء التحليل المائى للبروتينات والببتيدات بغرض الحصول على الأحماض الأمينية الحرة لدراسة مكوناتها كذلك الطرق المختلفة لتحضير مشتقات الأحماض الأمينية للكشف عنها وتقديرها كميا سواء باستخدام جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائلى أو جهاز تحليل الأحماض الأمينية ثم مقارنة كفاءة هذه الطرق مع بعضها البعض. وقد ذكرت التطبيقات المختلفة التى تعتمد على نوعية الأحماض الأمينية، فعلى سبيل المثال الكشف عن غش اللحوم الحمراء بلحم الدجاج وتحديد المصدر النباتى الذى استخدم فى تحضير المنتجات الغذائية.

وأسأل الله أن يفيد هذا الكتاب ولو بالجزء اليسير للسادة القائمين بالبحوث الأكاديمية والتطبيقية.

المحتـــويات

الموضـــــوع	الصفحة

أولاً: الأحماض الأمينية

تعتبر الأحماض الأمينية ضمن المكونات الأساسية لجميع الأغذية ومع ذلك فانه يوجد اختلافا كبيرا فى محتواها من الأحماض الأمينية. وهى توجد كمكون أساسى فى تكوين البروتينات، وعند هضم البروتين فانه يعطى أحماض أمينية حرة وببتيدات قصيرة السلسلة تمتص بواسطة الجسم. وتستخدم الأحماض الأمينية فى الغذاء لإنتاج البروتينات اللازمة لاعطاء التركيب البنائى والوظائف الفسيولوجية للأنسجة المختلفة وكذلك الهرمونات وأعضاء الجهاز العصبى. ومن المعروف أن احتياجات الحيوانات للأحماض الأمينية تختلف عن بعضها البعض تبعاً للنوع. وكذلك تختلف إحتياجات الكائنات الحية من الأحماض الأمينية طبقاً للعمر. لذلك لابد من وجود كميات مناسبة من كل حمض أمينى فى الغذاء. والجدول فى صفحة ٢ يبين إحتياجات الإنسان من الأحماض الأمينية الأساسية طبقاً لمراحل النمو.

وتعتبر الأحماض الأمينية مركبات عضوية ذات أوزان جزيئية منخفضة تتراوح ما بين ١٠٠– ٢٠٠ وتحتوى على الأقل على مجموعة كربوكسيل واحدة (-COOH) ومجموعة أمين واحدة ($-NH_2$). وترجع الاختلافات بين الأحماض الأمينية المختلفة إلى طبيعة مجموعات السلاسل الجانبية (-R) والتى لها أهمية أساسية وتميز كل حمض أمينى عن الآخر.

α-Amino group
R
H
N—C—C
O
O—H
H
H
α-Carboxyl group

الرمز العام للحمض الأمينى

احتياجات الإنسان من الأحماض الأمينية الأساسية

الحمض الأمينى (مجم/ كجم)	العمر ٣ – ٦ أشهر	١٠ – ١٢ سنة	البالغ
أيزوليوسين	٧٠	٣٠	١٠
ليوسين	١٦١	٤٥	١٤
ليسين	١٠٣	٦٠	١٢
ميثيونين + سستين	٥٨	٢٧	١٣
فينايل آلانين + تيروزين	١٢٥	٢٧	١٤
ثريونين	٧٨	٣٥	٧
تريبتوفان	١٧	٤	٤
فالين	٩٣	٣٣	١٠
كمية الأحماض الأمينية الأساسية الكلية	٧١٤	٢٦١	٨٤
كمية الأحماض الأمينية الأساسية الكلية: كمية البروتين المطلوبة	٠,٣٩	٠,٣٣	٠,١٥

من المعروف أن الهستدين هو حمض أمينى أساسى بالنسبة للأطفال ويحتاج البالغ الى مستويات منخفضة منه. هذه الأرقام مأخوذة من FAO/ WHO (1973).

ومن معرفة التركيب الكيميائى للمجموعة R فانه يمكن استنتاج خواص الأحماض الأمينية وبالتبعية عند معرفة خواص الحمض الأمينى فانه يمكن التعرف على ماهية المجموعة R ثم الحمض الأمينى. والجدير بالذكر أنه يوجد تقريبا ١٨ حمض أمينى مختلف فى البروتينات الطبيعية.

وفى الطبيعة توجد الأحماض الأمينية فى الصورة اليسارية (L-form) وتوجد أيضا فى الطبيعة بعض الأحماض الأمينية فى الصورة اليمينية (D-Form) ولكنها متخصصة جداً فهى عادة ما توجد مرتبطة مع مركبات أخرى غالبا ما تكون سامة.

١-١ التركيب والخصائص العامة للأحماض الأمينية:

يوجد تقريبا ٢٠ حمض أمينى فى البروتينات وكلها ألفا أمينو ماعدا حمضين ألفا ايمينو وهما البرولين والهيدروكسى برولين. ويطلق على الأحماض الأمينية ألفا نظرا لإرتباط مجموعة الأمين على ذرة الكربون ألفا للسلسلة وهى ذرة الكربون المجاورة لمجموعة الكربوكسيل. والجدير بالذكر أن كلا المجموعتين الكربوكسيل والأمين تكونا متصلتين بذرة كربون واحدة.

$$\overset{\varepsilon}{C}-\overset{\delta}{C}-\overset{\gamma}{C}-\overset{\beta}{C}-\overset{\alpha}{C}-COOH$$

$$\begin{array}{ccc} CH_2 - CH_2 & & HO\cdot CH - CH_2 \\ | \quad\quad | & & | \quad\quad\quad | \\ CH_2 \quad CH\cdot COOH & & CH_2 \quad CH\cdot COOH \\ \diagdown NH \diagup & & \diagdown NH \diagup \end{array}$$

Proline — Hydroxyproline

α-Imino acids.

كما يوجد عديد من المركبات لها تركيب كيميائى يشابه تركيب الأحماض الأمينية منتشرة فى الطبيعة ولا توجد فى البروتين ولها أهمية خاصة فى التمثيل الغذائى أو كمكونات للنباتات أو كمضادات حيوية Antibiotics.

والرموز التالية تبين التركيب الكيميائى لبعض منها:

α – Alanine

$$CH_3-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH$$

β – Alanine

$$\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH_2}-CH_2-COOH$$

α – Aminobutyric acid

$$CH_3-CH_2-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH$$

γ – Aminobutyric acid

$$\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH_2}-CH_2-CH_2-COOH$$

Structure of alternative forms of amino acids

والجدول التالى يبين بعض خواص المركبات القريبة فى تركيبها الكيميائى للأحماض الأمينية التى توجد فى نوعية خاصة جدا من البروتينات أو فى الصورة الحرة.

الحمض الأمينى	أهمية التمثيل الغذائى أو مصدر النسيج	الرمـــز
ألفا أمينو حمض البيوتريك	أنســجــة النبــات والحيوان	CH_2- CH_2- $CHNH_2$- COOH
ألفا جاما ثنائى أمين حمض البيوتريك	مضادات حيوية	CH_2- NH_2- $CHNH_2$- COOH
بيتا الأنين	معاون إنزيمى أ COA	CH_2- NH_2- CH_2- COOH
جاما امينو حمض البيوتريك	أنسجة المخ	CH_2- NH_2- CH_2- CH_2- COOH
الفا ابيسلون ثنائى امينو حمض بيميليك Pimelic	جدر الخلايا البكتيرية	HOOC-$CHNH_2$- $(CH_2)_3$ | H_2N-CH- COOH

التركيب الكيميائى للأحماض الأمينية ألفا اليسارية الموجودة فى البروتينات

المجموعة	الاسم الشائع	الاسم الكيماوي	التركيب الكيميائي
	أحماض أمينية لها سلاسل أليفاتية		
الأولى	Glycine*	Aminoacetic acid	$H-CH(NH_2)-COOH$
	Alanine	α-Aminopropionic acid	$CH_3-CH(NH_2)-COOH$
	Valine	α-Aminoisovaleric acid	$(H_3C)_2CH-CH(NH_2)-COOH$
	Leucine	α-Aminoisocaproic acid	$(H_3C)_2CH-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	Isoleucine	α-Amino-β-methylvaleric acid	$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH$
	أحماض أمينية لها سلاسل جانبية بها مجاميع أيدروكسيلية		
الثانية	Serine	α-Amino-β-hydroxypropionic acid	$CH_2(OH)-CH(NH_2)-COOH$
	Threonine	α-Amino-β-hydroxy-n-butyric acid	$CH_3-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$
	أحماض أمينية لها سلاسل جانبية بها ذرات كبريت		
الثالثة	Cysteine†	α-Amino-β-mercaptopropionic acid	$CH_2(SH)-CH(NH_2)-COOH$
	Methionine	α-Amino-γ-methylthio-n-butyric acid	$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	أحماض أمينية بها سلاسل جانبية حامضية أو أميدية		
الرابعة	Aspartic acid	α-Aminosuccinic acid	$HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	Asparagine	γ-Amide of α-aminosuccinic acid	$H_2N-C(=O)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

*تدل العلامة على أن الجليسين لا يوجد فى الصورة اليمينية أو اليسارية نظرا لعدم أحتوائه على ذرة كربون غير متناسقة

التركيب الكيميائى للأحماض الأمينية ألفا اليسارية الموجودة فى البروتينات

المجموعة	الإسم الشائع	الإسم الكيماوى	التركيب الكيميائى
الرابعة	Glutamic acid	α-Aminoglutaric acid	$HOOC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	Glutamine	δ-Amide of α-aminoglutaric acid	$H_2N-C(=O)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	أحماض أمينية بها سلاسل جانبية قاعدية		
الخامسة	Arginine	α-Amino-δ-guanidino-n-valeric acid	$H-N(C(=NH)NH_2)-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	Lysine	α,ε-Diaminocaproic acid	$CH_2(NH_2)-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	Hydroxylysine*	α,ε-Diamino-δ-hydroxy-n-caproic acid	$CH_2(NH_2)-CH(OH)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	Histidine	α-Amino-β-imidazolepropionic acid	(imidazole ring: HN, N)$-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	أحماض أمينية بها حلقات عطرية		
السادسة	Phenylalanine	α-Amino-β-phenylpropionic acid	$C_6H_5-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	Tyrosine	α-Amino-β-(*p*-hydroxyphenyl) propionic acid	$HO-C_6H_4-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	Tryptophan	α-Amino-β-3-indolepropionic acid	(indole ring, N−H)$-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	أحماض أمينية إيمينية		
السابعة	Proline	Pyrrolidine-2-carboxylic acid	(pyrrolidine ring, N−H)$-COOH$
	4-Hydroxyproline	4-Hydroxypyrrolidine-2-carboxylic acid	HO−(pyrrolidine ring, N−H)$-COOH$

* تدل العلامة على أن الهيدروكسى ليسين يوجد فقط فى الكولاجين والجيلاتين.

الخواص العامة للأحماض الأمينية الشائعة

الحمض الأميني	الرمز الجزيئي	الوزن الجزيئي	درجة حرارة التكسير (°م)	الذوبان في الماء (جم %)	قيم ثوابت الانقسام	نقطة التعادل الكهربي	التحويل الضوئي $[\alpha]_D$
L-Alanine	$C_3H_7O_2H$	89.09	297	166.5 (25°C)	2.34, 9.69	6.01	+2.8 (w, c = 6, 25°C)
L-Arginine	$C_6H_{14}O_2N_4$	174.20	244	148.7 (20°C)	2.01, 9.04, 12.48	10.76	+12.5 (w, c = 3.5, 20°C)
L-Asparagine	$C_4H_8O_3N_2$	132.12	234–235	35.3 (28°C)	2.02, 8.80	5.41	−5.42 (w, c = 1.3, 20°C)
L-Aspartic acid	$C_4H_7O_4N$	133.10	270–271	4.5 (20°C)	2.10, 3.86, 9.82	2.98	+4.36 (w, c = 1, 20°C)
L-Cysteine	$C_3H_7O_2NS$	121.16	240	160 (20°C)	1.71, 8.27, 10.78	5.02	+9.8 (w, c = 1.3, 30°C)
L-Cystine	$C_6H_{12}O_4N_2S_2$	240.30	260–261	0.112 (25°C)	1.04, 2.05, 8.0, 10.25	5.02	−223 (1 N HCl, c = 1, 20°C)
L-Glutamic acid	$C_5H_9O_4N$	147.13	247–249	8.64 (25°C)	2.10, 4.07, 9.47	3.08	+31.4 (6 N HCl, c = 1, 22°C)
L-Glutamine	$C_5H_{10}O_3N_2$	146.15	185–186	26.0 (18°C)	2.17, 9.13	5.65	+6.5 (w, c = 2, 25°C)
Glycine	$C_2H_5O_2N$	75.07	233–290	250 (25°C)	2.35, 9.78	6.06	Not Active
L-Histidine	$C_6H_9O_2N_3$	155.16	287	41.9 (25°C)	1.77, 6.10, 9.18	7.64	−39.7 (w, c = 1.13, 20°C)
L-Isoleucine	$C_6H_{13}O_2N$	131.17	284	41.2 (25°C)	2.36, 9.68	6.02	+11.29 (w, c = 3, 20°C)
L-Leucine	$C_6H_{13}O_2N$	131.17	293–295	24.3 (25°C)	2.36, 9.60	5.98	−10.8 (w, c = 2.2, 25°C)
L-Lysine	$C_6H_{14}O_2N_2$	146.19	224.5	>1000 (25°C)	2.18, 8.95, 10.53	9.47	+14.6 (w, c = 6.5, 20°C)
L-Methionine	$C_5H_{11}O_2NS$	149.21	280–282	53.7 (20°C)	2.28, 9.21	5.74	−8.2 (w, c = 1, 25°C)
L-Phenylalanine	$C_9H_{11}O_2N$	165.19	283	29.6 (25°C)	1.83, 9.13	5.48	−35.1 (w, c = 2, 20°C)
L-Proline	$C_5H_9O_2N$	115.13	220–2	1620 (25°C)	2.00, 10.60	6.30	−80.9 (w, c = 1, 20°C)
L-Serine	$C_3H_7O_3N$	105.09	228	359.7 (20°C)	2.21, 9.15	5.68	−6.8 (w, c = 10, 20°C)
L-Threonine	$C_4H_9O_3N$	119.12	255–257	90.3 (20°C)	2.71, 9.62	6.16	−28.3 (w, c = 1.1, 26°C)
L-Tryptophan	$C_{11}H_{12}O_2N_2$	204.22	290–292	11.4 (25°C)	2.38, 9.39	5.88	−31.5 (w, c = 0.5, 20°C)
L-Tyrosine	$C_9H_{11}O_3N$	181.19	342–344	0.453 (25°C)	2.20, 9.11, 10.07	5.63	−10.6 (1 N HCl, c = 4, 22°C)
L-Valine	$C_5H_{11}O_2N$	117.15	315	88.5 (25°C)	2.32, 9.62	5.96	+22.9 (20%HCl, c = 0.8,23°C)

تدل الحروف W و C على الماء كمذيب والنسبة المئوية للتركيز (وزن/حجم) على التوالي.

١-٢- الحروف المختصرة للأحماض الأمينية Amino acid symbols

الحمض الأمينى Amino acid	الرمز بثلاث حروف Three-letter symbol	الرمز بحرف واحد One-letter symbol
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Asn+Asp	Asx	B
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Flu	E
Glu+Gln	Glx	Z
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

الأحماض الأمينية بصفة عامة مواد غير متطايرة، بللورات بيضاء اللون فى الصورة النقية وليس لها درجات انصهار محددة ولكنها تتكسر عند درجات الحرارة التى تتراوح ما بين ١٨٥ و ٣٤٠°م، وعادة لها نشاط ضوئى ما عدا الجليسين، وتذوب إلى حد ما فى الماء وتنخفض درجة ذوبانها فى الماء إلى حد كبير عند نقطة التعادل الكهربى للجزىء.

والأحماض الأمينية لا تذوب فى المذيبات العضوية ماعدا البرولين والهيدروكسى برولين اللذان لهما درجة ذوبان معقولة فى كحول الايثايل. وجميع الأحماض الأمينية تكون أملاح ثابتة.

والجداول السابقة تبين التركيب الكيميائى، الرموز المختصرة (حرف واحد- ثلاثة حروف) وخواص الأحماض الأمينية الشائعة.

١-٣- الخواص الآيونية Ionic properties

تحتوى الأحماض الأمينية على مجموعات حمضية (-COOH) وقاعدية ($-NH_2$)، ونتيجة لذلك فإنها يمكن أن تتفاعل كحمض ضعيف وكقاعدة ضعيفة ولذلك تسمى Ampholytes ويطلق على هذا السلوك باسم Amphiprotic حيث أنها يمكن أن تكتسب أو تعطى بروتون، والذى يمثله التفاعل التالى:-

$$R\text{-}N^{+}H_3\text{-}COOH \underset{}{\overset{+H^+}{\rightleftarrows}} R\text{-}NH_2\text{-}COOH \overset{-H^+}{\rightleftarrows} R\text{-}NH_2\text{-}COO^- + H^+$$

وتتأين المجاميع القابلة للتأين فى الجزىء فى المحلول كما يلى:-

$$-COOH \rightarrow -COO^- + H^+$$

$$-NH_3^+ \rightarrow -NH_2 + H^+$$

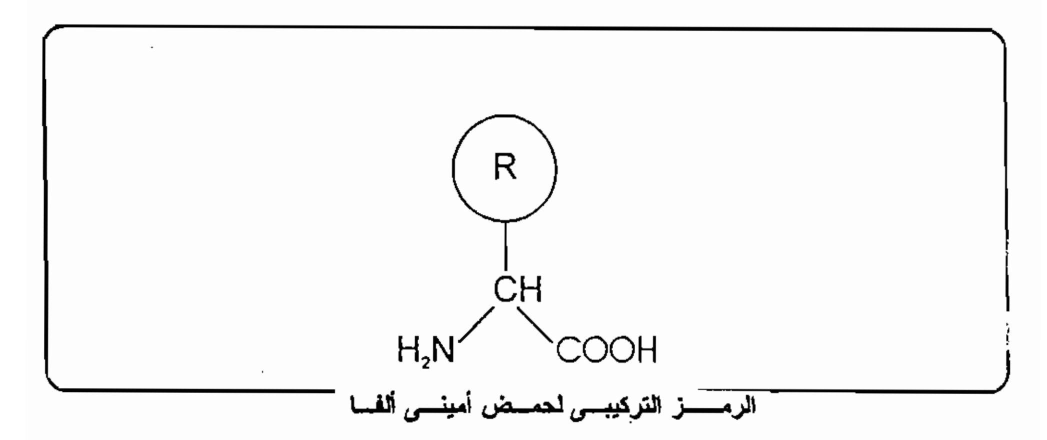
وعلى ذلك يوجد للحمض الأمينى فى المحلول صورة تسمى ثنائى القطبية Dipolar أو زويتـــر آيون Zwitter ion، أى أنه فى المحلول المائى توجـــد الأحماض الأمينية فى الصورة المشحونة حيث تتأين كلا المجموعتين الكربوكسيلية والأمينية. وتحتوى بعض الأحماض الأمينية على مجاميع أخرى إضافية قابلة للتأين فى السلسلة الجانبية، وأن تأين المجموعة يعتمد على درجة حموضة الوسط (pH)، وكل حمض أمينى له درجة حموضة عندها يكون مجموع الشحنات متساويا وبالتالى لا يحمل الجزىء أى شحنة وتسمى فى هذه الحالة باسم نقطة التعادل الآيونى Iso-ionic point (PI).

$$NH_3^+{-}\underset{\displaystyle H}{\overset{\displaystyle CH_3}{C}}{-}COOH \longleftrightarrow HN_3^+{-}\underset{\displaystyle H}{\overset{\displaystyle CH_3}{C}}{-}COO^- \longleftrightarrow NH_2{-}\underset{\displaystyle H}{\overset{\displaystyle CH_3}{C}}{-}COO^-$$

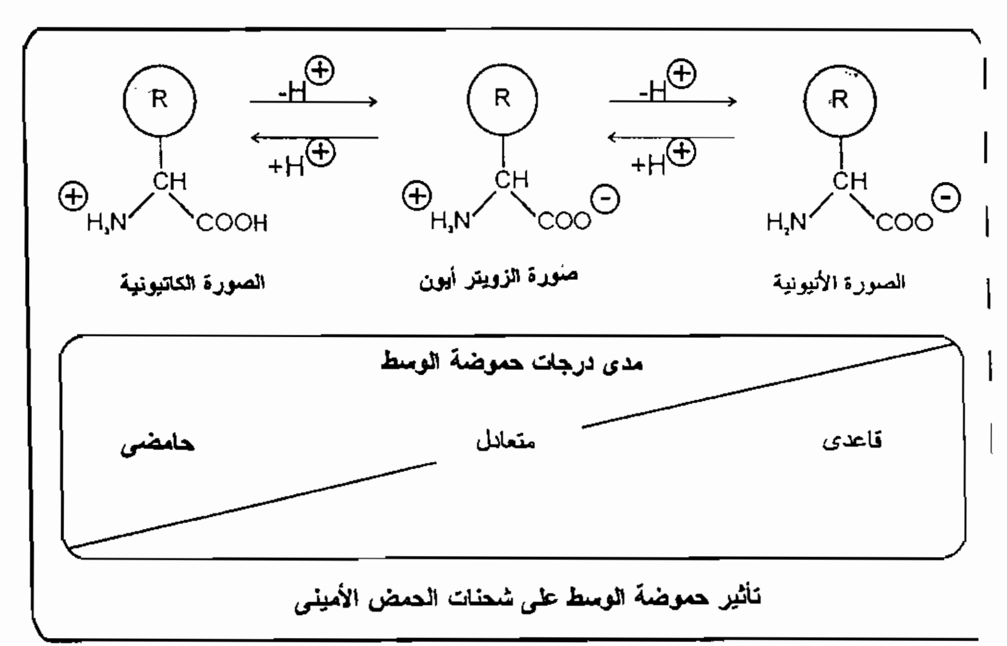
Cationic form	**Zwitter ionic form**	**Anionic form**
الصورة الكاتيونية	صورة الزويتر أيون	الصورة الأنيونية

تعتمد الشحنات الكلية لأى حمض أمينى على درجة حموضة الوسط (pH) وكذلك قيم ثوابت الانقسام (pka) للمجموعات القابلة للتأين الموجودة. فإذا كانت درجة حموضة الوسط أكبر من ثابت الانقسام للمجموعة فان الجزىء يفقد بروتون. ويحمل الجزىء شحنة سالبة وكذلك عند درجات حموضة (pH) منخفضة (توجد تركيزات مرتفعة من البروتونات) تكتسب مجموعة الكربوكسيل بروتون وبالتالى تصبح غير مشحونة والشحنة الكلية على الجزىء تكون موجبة.

وعند درجات حموضة (pH) مرتفعة (توجد تركيزات منخفضة من البروتونات) تفقد مجموعة الأمين بروتونها وبالتالى تصبح غير مشحونة، والشحنة الكلية على الجزىء تكون سالبة. وكذلك إذا كانت درجة حموضة



الرمـــز التركيبـــى لحمـــض أمينـــى ألفـــا



تأثير حموضة الوسط على شحنات الحمض الأمينى

المحلول أقل من ثابت الانقسام فإن الجزىء يحمل شحنة موجبة. وفى الحقيقة عند درجات حموضة وسط متغيرة نلاحظ أن الأحماض الأمينية توجد فى صور آيونية مختلفة وتحمل شحنات مختلفة يمكن استخدامها فى عديد من الطرق التحليلية مثل الفصل عن طريق الهجرة فى المجال الكهربى electrophoresis والتبادل الآيونى الكروماتوجرافى فى فصل كل حمض أمينى عن الآخر.

والمثال التالى يبين سلوك الحمض الأمينى أسبارتيك فى محاليل مختلفة على درجات حموضة (pH) متباينة

حمض اسبارتيك	درجة حموضة الوسط	محصلة الشحنات
$H_3{}^+N-CH(CH_2-COOH)-COOH$ ⟶	pH=1	1
$H_3{}^+N-CH(CH_2-COOH)-COO^-$ ⟶	pH=2.8 Isoionic point	0
$H_3{}^+N-CH(CH_2-COO^-)-COO^-$ ⟶	pH=6.6	-1
$H_2N-CH(CH_2-COO^-)-COO^-$ ⟶	pH=11	-2

ثانيا: تقسيم الأحماض الأمينية

أولا: تقسم الأحماض الأمينية تبعا لنوعية التركيب الكيميائى والسلسلة الجانبية كما فى الجدول التالى:-

التركيب الكيميائى للسلسلة الجانبية	الأمثلة
اليفاتية	Gly,Ala, Val, Leu
عطرية	Phe,Tyr, Trp
هيدروكسيلية	Ser, Thr
كربوكسيلية	Asp, Glu
كبريتية	Cys, Met
ايمينو	Pro,Hyp
أمينو	Lys, Arg
أميد	Asn, Gln

ثانيا: تقسم الأحماض الأمينية إلى ثلاثة أقسام أساسية بالنسبة لتغذية الإنسان وهى:-

١- ضرورية Essential:

يلزم تناولها فى الغذاء ولا يستطيع الجسم تخليقها.

٢- غير ضرورية Non-essential:

يكونها الجسم من مكونات الغذاء

٣- ضرورية تحت ظروف خاصة Conditionally essential:

تختلف باختلاف الحالة.

وبصفة عامة، يقوم الغذاء بتزويد الكائن الحى بكل ما يلزمه (يحتاجه) من مغذيات كبرى أو صغرى لازمة لنموه والحفاظ على حياته على الصورة الأمثل. وتستطيع أغلب الكائنات الحية تخليق على الأقل بعض الأحماض (غير الأساسية) من مصادر غذائية أخرى أو من أحماض أمينية أخرى. وعلى ذلك فالأحماض الأمينية التى لا يمكن تكوينها داخليا (أساسية) يلزم الحصول عليها من الطعام. وتوجد أيضا حالات مرضية خاصة بعد العمليات الجراحية تصبح عندها بعض الأحماض الأمينية غير الأساسية أساسية تحت هذه الظروف.

والجدول التالى يبين الأحماض الأمينية التى تقع تحت كل قسم من الأقسام سالفة الذكر.

Essential ضرورية	Non- Essential غير ضرورية	Conditionally Essential ضرورية تحت ظروف خاصة
Histidine Isoleucine Leucine Lysine Methionine Phenylalnine Threonine Tryptophan Valine	Alanine Arginine Asparagine Aspartate Cysteine Glutamate Glutamine Glycine Proline Serine Tyrosine	Arginine [a] Glutamine [b] Cysteine [c] Tyrosine [d] Ile, Leu, Val [e] Taurine [f]

(a) قد يكون ضروريا فى تغذية الأطفال أو التغذية الكاملة عن طريق القناة الهضمية Parenteral nutrition

(b) يساعد على إسراع العلاج من النزلات المعوية.

(c) حمض أساسى فى الأطفال قبل سن البلوغ وبصفة عامة جميع الأحماض الكبريتية أساسية للأطفال.

(d) حمض أساسى فى حالة مرضى فينايل كيتويوريا Phenyl keto urea (التمثيل الغذائى غير السليم للحمض فينايل الآنين).

(e) أساسى فى حالة مرضى الكبد Hepatic disease.

(f) أساسى فى حالة الحيوانات حديثة الولادة وبصفة خاصة القطط.

ثالثا: علاقة الأحماض الأمينية بالغذاء.

الجدول التالى يبين الاحتياجات اليومية من الأحماض الأمينية الأساسية للانسان.

L-Amino acid	Aduts (gram/day)
Tryptophan	0.25
Phenyl alanine	1.10
Lysine	0.80
Threonine	0.50
Valine	0.80
Methionine	1.10
Leucine	1.10
Iso Leucine	0.70

لذلك تظهر أهمية تقدير الأحماض الأمينية فى المصادر المختلفة كما فى الحالات التالية:-

(١) التغذية علي مصدر واحد

فى حالة تحديد نوعية التغذية Dietary restriction أو فى حالات التغذية على مصدر واحد فان مكونات هذا المصدر لا تفى بكل الاحتياجات البيولوجية وأنه يلزم فى هذه الحالة معرفة تركيب الأحماض الأمينية فى أطعمة الأطفال والأغذية التى تستخدم فى تغذية البالغين الناتجة من مصدر وحيد للتغذية Sole source.

(٢) أهمية إضافة الأحماض الأمينية لبعض الأغذية

توجد حالات لابد من اجراء التحليل لمعرفة اذا ما كان مضاف حمض أمينى أو أكثر الى الطعام. وهذه حقيقة هامة عند التغذية الخاصة، اذا كان المطلوب تحسين نوعية التغذية لمصدر بروتينى بالاستعانة بحمض أمينى معين. فمثلا يضاف الحمض الأمينى ميثيونين لتدعيم فول الصويا فى أطعمة الأطفال، كذلك تضاف بعض المركبات لتدعيم التغذية الطبية مثل التدعيم بالجلوتامين أو الأرجنين للمرضى تحت الضغط العصبى. ومن الضرورى التأكد من أن المصانع تضيف الكمية المطلوبة من الحمض الأمينى وتعتبر كشرط من جودة الصناعة.

(٣) غياب بعض الأحماض الأمينية ذات القيمة الحيوية

يجرى التحليل المائى للأحماض الأمينية لإظهار غياب واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية حيث توجد حالات مرضية خاصة والتى ترتبط بوجود أحماض أمينية معينة وهى ضرورية للصحة. ومن أمثلة ذلك مرض الفينايل كيتويوريا (Phenyl Keto Urea (PKU ولذلك يجب تحديد كمية الفينايل الآنين. كما أن وجود الأحماض المتفرعة مثل Lsoleucine, Leucine, Valine تظهر مشاكل بالنسبة لمرضى (Maple syrup urine disease (MSUD. لذلك لابد من تحليل الأطعمة للأشخاص للتحقق من الحد الأعلى من هذه الأحماض الأمينية. وتوجد بعض المصانع تضع بطاقة تحذيرية على الأطعمة فمثلا «هذا المنتج يحتوى على فينايل الآنين» أو تكتب تركيزات أحماض أمينية معينة خاصة بالمنتج. ومثال آخر لهذه الحالة أنه لابد من ذكر تركيز أحادى صوديوم جلوتامات MSG حيث يبين مستويات حمض الجلوتاميك الحر فى الأطعمة.

(٤) استخدام تحليل الأحماض الأمينية لمعرفة الأخطار من التمثل الغذائي لها

أظهرت التقارير فى القرن السابق على وجود تمثيل غذائى غير سليم Disor-der راجع إلى الجينات وتبين أن العيوب فى جين واحد أو الكروموزومات غير السليمة Abnormalities تقع فى حدود ٨-١٠ ٪ فى الأطفال. وأن حوالى ٥ ٪ من تعداد الأفراد الذين لهم عمر أقل من ٢٥ عاما لهم تمثل غذائى للأحماض الأمينية غير سليم Metabolic disorder. وتستجيب بعض هذه الأمراض للعلاج إذا تم الكشف عنها مبكرا. وأمكن تشخيص ٥٠ مرض نتيجة التغيير فى التمثيل الغذائى للأحماض الأمينية. ومن الأمراض الشائعة الفينايل كيتو يوريا Pheny Keto Urea Histidinemia (زيادة تركيز الهستدين فى الدم)، Argininosuccinaciduria و Hyperphenylalaninemia. وأن تشخيص التمثيل الغذائى غير السليم ليس مهما فقط للحصول على العلاج المناسب ولكنه أيضا مهما لمنع انتقال هذه الصفة إلى الأطفال حيث أنه يوجد احتمال مقدار ٢٥ ٪ للانتقال إلى الطفل.

(٥) منع المشاكل عند تجهيز الأطعمة Formulation problems

تحدث مشاكل كثيرة عند إعداد الطعام منها تلون الأطعمة بلون بنى وهذا اللون يرجع عادة إلى وجود مجموعة الأمين البعيدة للحمض الأمينى ليسين. وفى السنوات الأخيرة أصبحت هناك أهمية كبيرة لمعرفة نواتج التحليل المائى للبروتين وتقدير مجموعات الأمين (أحماض أمينية حرة + مجموعة الأمين الطرفية + مجموعة الأمين البعيدة لليسين) لما لها من مشاكل خطيرة فى تصنيع الغذاء. تظهر نواتج تفاعل ميلارد Maillard اللونى مجموعة من المشاكل تتمثل فى منع الهضم وإحداث طفرات ولذلك فان منع تكوين هذا اللون فى صناعة الأغذية أو فى الأطعمة شيء مرغوب جدا.

(٦) اختبــارات الجـــودة

تستخدم بعض الأحماض الأمينية ومشتقاتها كمواد مشجعة للرائحة مثل أحادى جلوتامات الصوديوم. وفى بعض الأحيان يكون مطلوب التدعيم بواحد أو أكثر من الأحماض الأمينية لرفع القيمة الغذائية للبروتين. ومن أمثلة ذلك بروتين فول الصويا يجب تدعيمه بالمثيونين كما أنه يجب تدعيم بروتين الأرز بالليسين والثريونين.

(٧) موضوعات قانونية Legal issues

يجب أن تحتوى أغذية الأطفال على كميات مناسبة وجودة عالية من البروتين وهذا يتم بتقدير نوعية وكمية الأحماض الأمينية ونسبة كفاءة البروتين. وفى حالات كثيرة لابد من إضافة بعض الأحماض الأمينية الحرة لرفع القيمة الغذائية للبروتين. وعلى ذلك يلزم إما إجراء تحليلات بسيطة مثل التعرف الكامل على الأحماض الأمينية، كما توجد تحليلات أكثر تعقيداً تتمثل فى تقدير الاتاحة الحيوية Bioavilability للأحماض الأمينية خاصة فى الأطعمة التى تستخدم كمصدر وحيد للتغذية.

ويمكن استخدام تقدير مدى قابلية البروتين للهضم والمقياس الكيميائى للأحماض الأمينية كاختبارات لمعرفة جودة البروتين.

٣-١- وجود الأحماض الأمينية في الطعام:

توجد الأحماض الأمينية فى صورتين وهما:-

١) الصـورة الحـــرة Free form

توجد الأحماض الأمينية الحرة فى الأجزاء النباتية Plant materials وفى الثمار ومنتجاتها Fruit products وكذلك فى الطعام المتخمر Fermented food.

٢) الصورة المرتبطة Bound form

حيث ترتبط الأحماض الأمينية بواسطة روابط ببتيدية كما هو الحال فى الببتيدات البسيطة والعديدة والبروتينات. وبصفة عامة يجرى تحليل للأحماض الأمينية فى المجالات التالية:

١- أبحاث البروتينات والببتيدات.

٢- تحليل الأغذية ومواد العلف.

٣- تحليل المشروبات الروحية وعصائر الفاكهة.

٤- تحليل السوائل الفسيولوجية.

٥- تحليل المستخلصات النباتية.

٦- تحليل البيئات المتخمرة.

٧- تحليل الأمينات العديدة، أمينات الكاتيكول، نواتج التمثيل الغذائى للتريبتوفان.

رابعا- تحليل الأحماض الأمينية في المنتجات الغذائية

٤-١- تحليل الأحماض الأمينية الحرة

يلزم تحليل الأحماض الأمينية الحرة فى نواتج التصنيع النهائية وأيضا فى العينات تحت التصنيع المعقدة نسبيا. وفى جميع الأحوال فانه يلزم تحضير العينة لتقدير محتواها من الأحماض الأمينية الحرة.

وبصفة عامة يجب أن تكون العينة فى صورة قابلة للاستخلاص، ففى حالة العينات السائلة وأغلب المساحيق فانه يمكن استخلاص الأحماض الأمينية منها بكفاءة قبل التحضير، وفى حالة المواد الصلبة (منتجات اللحوم... الخ) فانه يلزم تجنيس العينة أو تحويلها إلى صورة مسحوق (المواد الصلبة الجافة) للحصول على كفاءة استخلاص عالية.

فى حالة العينة الجاهزة للاستخلاص فانه يجرى رجها مع مذيب مناسب وهو القادر على ذوبان الأحماض الأمينية الحرة. ومع ذلك يظهر الليوسين والسيستئين مشاكل فى الذوبان حيث يحتاجا إلى ظروف حمضية نسبيا. وهناك بعض الأحماض الأمينية مثل التريتوفان ترتبط بقوة مع البروتينات فى سيرم الدم ولبن الإنسان فيلزم فى هذه الحالة فترات رج طويلة لذوبانها بالكامل. وتظهر هذه المشكلة فى حالة المعامل الطبية حيث يجرى تحليل الأحماض الأمينية الحرة للأغراض التشخيصية. ويستخدم بصفة خاصة مذيب واحد وهو حامض الهيدروكلوريك المخفف، حيث ترج العينة مع ١,٥ عيارى HCl لمدة لا تقل عن ١٥ دقيقة على درجة المعمل. يتبع ذلك ضبط درجة حموضة الوسط ثم تخفيف العينة قبل تحليل الأحماض الأمينية. ويجب منع تسخين العينة نظرا لوجود العديد من الأحماض الأمينية التى يتغير تركيبها فى الظروف الحمضية عند درجات الحرارة العالية.

٤-٢- تحليل الأحماض الأمينية المرتبطة

يلزم عند تحليل الأطعمة معرفة التركيب العام للأحماض الأمينية الشائعة، وهذا يتطلب تحليل البروتينات والببتيدات تحليلا مائيا كاملا لتكسير الروابط الببتيدية التى تربط الأحماض الأمينية كما فى الشكل التالى

A-A-B-D-A-C-A-D-C-A

↓ تحليل مائى

5A+ lB+2C+2D

حيث A,B,C,D عبارة عن أحماض أمينية

وهناك العديد من المشاكل تحدث أثناء عملية التحليل المائى والتى تتضمن ما يلى:-

١- مشاكل الأحماض الأمينية التربتوفان السيستئين والسستين، حيث ينكسر التربتوفان فى وجود حمض قوى ساخن (خاصة فى وجود الكربوهيدرات) وأيضاً يتأكسد كبريت السيستئين والسستين.

٢- يحدث تكسير للسيرين والثريونين، حيث يحدث غالبا نزع الماء منهما.

٣- يحدث أثناء التحليل المائى تحليل الأميدات «الجلوتامين والأسباراجين» حيث تتحول إلى الأحماض المقابلة. وعلى ذلك، يقدر الجلوتامين والجلوتاميك على أساس جلوتامين كلى (GLX) والأسباراجين والأسبارتيك على أساس حمض اسبارتيك كلى (ASX)، أى الأحماض مع بعض.

٤- يوجد اختلاف فى الثبات الكيميائى Chemical stability لعديد من الأحماض الأمينية مثل التربتوفان.

٥- يلاحظ أن الرابطة الببتيدية للحمضين الأمينين الليوسين والأيزوليوسين ثابتة وتحتاج الى فترة تحليل مائى طويلة.

ولذلك فمن الضرورى استخدام طرق أخرى بديله لتقدير هذه النوعية من الأحماض الأمينية. وتوجد طرق مباشرة لتقدير هذه الأحماض الأمينية فمنها:-

التحليل بالفلورة للتربتوفان وكذلك تفاعل الجوهر الكشاف

5,5 -dithiobis (2-nitrobenzoic acid (DTNB) مع السستين والسستئين. وهذه الطرق تقدر هذه الأحماض فى البروتين مباشرة بدون إجراء التحليل المائى.

والجدول فى صفحة (٤٢) يبين الطرق المتخصصة للتحليل المائى باستخدام حمض HCl 7 عيار على درجة ١٠٥- ١٢٠° م لمدة ١٨-٢٤ ساعة.

وهذه الطريقة مناسبة لتقدير الأحماض الأمينية ألفا. وطرق التحليل المائى القاعدى (صودا كاوية، هيدروكسيد الليثيوم، هيدروكسيد الباريوم) على درجة ١٠٥- ١٢٠°م لمدة ١٨- ٢٤ ساعة للتربتوفان، والأكسدة بواسطة حمض بيرفورميك ثم يتبعه تحليل مائى لتقدير السستئين والسستين (على أساس حمض السستيك). ويلاحظ أن ظروف التفاعل مثل رفع درجة الحرارة، استخدام الميكروويف وإضافة مادة مضادة للأكسدة تؤثر فى عملية التحليل المائى.

وفيما يلى أسماء الأحماض الأمينية التى تنكسر أثناء التحليل المائى

جلوتامين
أسباراجين
تربتوفان
ثريونين

سيرين

سستين

ميثونين

بالإضافة الى الأحماض الأمينية سالفة الذكر يحدث أيضا فقد لبعض الأحماض الأمينية إذا أجريت أكسدة للعينة مع التحليل المائى وهى:

تيروزين

فينايل آلانين

هستدين

أرجنين

اختيار طريقة التحليل المائي

تختار أحد الطرق التالية:

- تحليل مائى بواسطة حمض معدنى.
- تحليل مائى بواسطة حمض عضوى.
- تحليل مائى بواسطة قلوى.

مع ملاحظة هل المطلوب:

أ – أكسدة العينة أثناء التحليل المائى.

ب– تقدير التربتوفان كميا.

جـ – إحتواء العينة على المركبات الكربوهيدراتية.

تجرى عمليه التحليل المائى باستخدام انبوبة إختبار مغلقة Sealed أو تجرى عملية التسخين تحت مكثف عاكس Reflux فى الجو العادى.

ويجب ملاحظة أنه لا توجد طريقة تحليل مائى واحدة تعطى استرجاع كامل لكل الأحماض الأمينية فى العينة.

٤-٣- تحضير العينات والمعاملات التي تجري عليها

تشمل هذه المعاملات على الترشيح، والتركيز معتمدا على خصائص العينة وفى الترشيح يمكن استخدام ورق الترشيح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر أو المرشحات الزجاجية لمنع مرور المركبات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة ثم تترك لتترشح بواسطة الجاذبية الأرضية، ولاسراع عملية الترشيح يجرى لها طرد مركزى. وفى تقديرات الأحماض الأمينية الحرة فانه يلزم التخلص من البروتين قبل التحليل المائى باستخدام حمض سلفوساليسيليك أو حمض بيركلوريك أو حمض ثلاثى كلوروخليك أو تنجستات صوديوم أو يرانيل حمض خليك أو استخدام مذيبات عضوية مثل أسيتو نتريل ثم يعقب ذلك الترشيح للتخلص من البروتين الراسب وأفضل جوهر كشاف هو حمض سلفوساليسيليك (SSA). وفيما يلى الخطوات المتبعة لترسيب البروتين هى:

١ مل عينة + ٥٠ مجم SSA فى أنبوبة اختبار

↓ رج

تترك لمدة ساعة على درجة ٤° م

↓

طرد مركزى لمدة ١٥ دقيقة على ٥٠٠٠ لفة/ دقيقة

↓

ترشيح الجزء الرائق من خلال ورق ترشيح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر

والطرق الأخرى التى تعمل على التركيز وإزالة الشوائب Concentration & clean up تشمل استخدام أعمدة قصيرة (Sep-pak) والمواد المعبأة تشمل Rexyn 101 (H), Amberlite IR 120، وتعمل هذه المواد على ارتباط الأحماض الأمينية بمتبادل كاتيونى قوى ثم الاستخلاص بواسطة قاعدة متطايرة

(أمونيا). ويجرى تبخير المذيب للحصول على الأحماض الأمينية الحرة. وفى حالة العينات الغنية بالدهون، فانه يلزم استخلاصها باستخدام هكسان أو أسيتون/كلوروفورم (١:٣). وبصفة عامة يجب التأكد من تمام استعادة وثبات الأحماض الأمينية. ولهذا يجب إجراء معايرة داخلية أو خارجية لمعرفة مدى الاستعادة Recovery، يلاحظ أنه كلما زادت الخطوات المعملية زاد الخطأ التجريبى. وفيما يلى ملخص للخطوات اللازم إجرائها قبل التقدير الكمى للأحماض الأمينية.

أولا- الأحماض الأمينية الحرة Free amino acids

١) السوائل Liquids

تجرى عملية تخفيف السوائل بالمحلول المنظم Loading or injection buffer ويعقبها ترسيب البروتينات ثم الترشيح من خلال مرشح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر باستخدام جهاز الطرد المركزى الفوقى Ultracentrifugation

٢) المواد الصلبة والمساحيق Solid and powder materials

تجرى الخطوات التالية:- تجفيف- تجانس- استخلاص بواسطة ٠,١ مولر HCl أو ميثانول (٧٠٪)- التركيز باستخدام جهاز Rotar evaporatorعلى درجة حرارة لا تتعدى ٤٠° م- الذوبان فى محلول منظم (Injection or load-ing) يعقبه الترشيح الفوقى Ultrafiltration

ثانيا- الأحماض الأمينية الكلية Total amino acids

تشمل الأحماض الأمينية الحرة والمرتبطة بعد تحليلها مائيا، حيث يجرى التحليل المائى إما باستخدام حمض عضوى أو غير عضوى أو قلوى- ويجب

الأخذ فى الاعتبار عند إختيار الطريقة المناسبة للتحليل المائى هل يلزم أكسدة للعينة قبل التحليل المائى- هل المطلوب تقدير التريتوفان كميا- هل العينة تحتوى على كربوهيدرات. ويجرى التحليل المائى للعينة إما فى أنبوبة مغلقة sealed ومفرغة باستخدام ٦ مولر حمض HC1 والتسخين على درجة ١١٥°م. وفيما يلى بعض الطرق المستخدمة فى التحليل المائى للبروتين:

١- التحليل المائي القلوي Alkaline hydrolysis

تؤخذ وزنة (١-٥ مجم) بروتين وتحلل مائيا بواسطة ٠,٥ سم٣ NaOH (٥ع) أو $Ba\ (OH)_2$ يحتوى على ٢٥ مجم نشا (مادة مضادة للأكسدة)- يلاحظ أن نسبة استرجاع التريتوفان هى ١٠٠٪ ولكنها غير مناسبة لأغلب الأحماض الأمينية.

٢- حمض ثيوجليكوليك Thioglycolic acid

تؤخذ وزنة (٠,١- ٠,٢ مجم) بروتين ويحلل مائيا بواسطة ٣ مل حمض HC1 (٦ع) يحتوى على ٢٪ حمض ثيوجليكوليك- يلاحظ أن نسبة إسترجاع التريتوفان هى ٨٥٪.

٣- حمض باراتولين سلفونيك P-Toluene sulfonic acid

تؤخذ وزنة (٢-٣ مجم) بروتين ويحلل مائيا بواسطة ١ مل حمض باراتولوين سلفونيك (٣ع) يحتوى على ٠,٢٪ تريتامين Tryptamine- يلاحظ أن نسبة إسترجاع التريتوفان هى ٩٤٪ فى غياب المواد الكربوهيدراتية، ٧٢٪ فى وجود ٣٠٪ كربوهيدرات فى العينة.

٤- حمض مركابتوإيثان سلفونيك Mercapto ethane sulphonic acid

تؤخذ وزنة (٠,٥- ٢ مجم) بروتين وتحلل مائيا بواسطة ١ مل حمض مركابتوإيثان سلفونيك (٣ع)- نسبة إسترجاع التريتوفان بهذه الطريقة هى ٩٥٪.

بالاضافة إلى ذلك يطبق التحليل المائى بالانزيمات لتقدير الجلوتامين والأسباراجين.

ويجب التنويه مرة أخرى الى أن الأحماض الأمينية التى يحدث لها تكسير أثناء عملية التحليل المائى هى: جلوتامين، أسباراجين، تريتوفان، ثريونين، سيرين، سستين، ميثيونين. ويحدث فقد فى كمية الأحماض الأمينية التالية عند أكسدة العينة قبل التحليل المائى: تيروزين، فينايل آلانين، هستدين، أرجنين.

والجدير بالذكر أنه لا توجد طريقة واحدة تعطى إسترجاع كامل لكل الأحماض الأمينية.

٤-٤- طرق التحليل المائي للأغذية ومواد العلف Food and feedstuff

١- تجرى عملية أكسدة قبل التحليل المائى للعينة- ويحضر مخلوط الأكسدة كما يلى:

٠,٥ مل فوق أكسيد الأيدروجين (٣٠٪) + ٤,٥ مل حمض فورميك (٨٨٪) + ٢٥ مجم فينول.

يحضن الخليط على درجة ٣٠°م لمدة نصف ساعة ثم يبرد على درجة الصفر المئوى لمدة ١٥ دقيقة.

٢- يجرى طحن للعينة (٠,١- ١جم) طحنا دقيقا ثم تبرد الى درجة الصفر المئوى.

بعض الطرق القياسية الشائعة للتحليل المائى للبروتينات

	ظروف التحليل المائى	ظروف التحليل المائى	ملاحظـــــات
1	6 N HC1 (with or without protectant, e.g., 2% thioglycolic acid)	16- 72 hrs, 110°C 4 hrs, 145-155°C microwave (minutes)	يجرى تحليل مائى لفترات مختلفة لتحديد الوقت الكافى لإتمام التحليل المائى- وأن وقت واحد فقط للتحليل المائى يكون غير مناسب- الهضم بأشعة الميكروويف يكون أسرع وهذه الطريقة غير مكلفة.
2	6N HC (with tryptamine)	22 hrs, 110°C	تجرى هذه الطريقة لتقدير مدى إسترجاع التريبتوفان حساسة للكربوهيدرات- لابد من تنقية clean up البيتيدات والبروتينات قبل تطبيق هذه الطريقة على الأطعمة. يحدث فقد قليل فى البيتيدات والأحماض الأمينية الحرة عند التخلص من الكربوهيدرات فى العينة.
3	4 N methanesulfonic acid (with or without protectant, e.g., 3- (2- aminoethy l)indole	22- 24 hr, 115°C	
4	Propionic + hydrochloric acid	50/50/v/v	تستخدم فى تحليل البيتيدات المرتبطة مع الراتنجات resin لا تستخدم فى التحليل المائى للأطعمة.
5	3 Np-Toluenesulfonic acid	22hr, 110°C	طريقة أخرى للتحليل المائى بديلة عن استخدام حمض HC1 محاولة للحصول على التريبتوفان والسستين بعملية تحليل مائى واحدة- مرتفعة الثمن عند استخدامهافى التحليل المائى للأطعمة.
6	3 N mercaptoethanesulfonic acid	22hr, 110°C	مثل ملاحظات الطريقة الخامسة.

تجرى هذه الطرق فى جو خامل أو مفرغ من الهواء

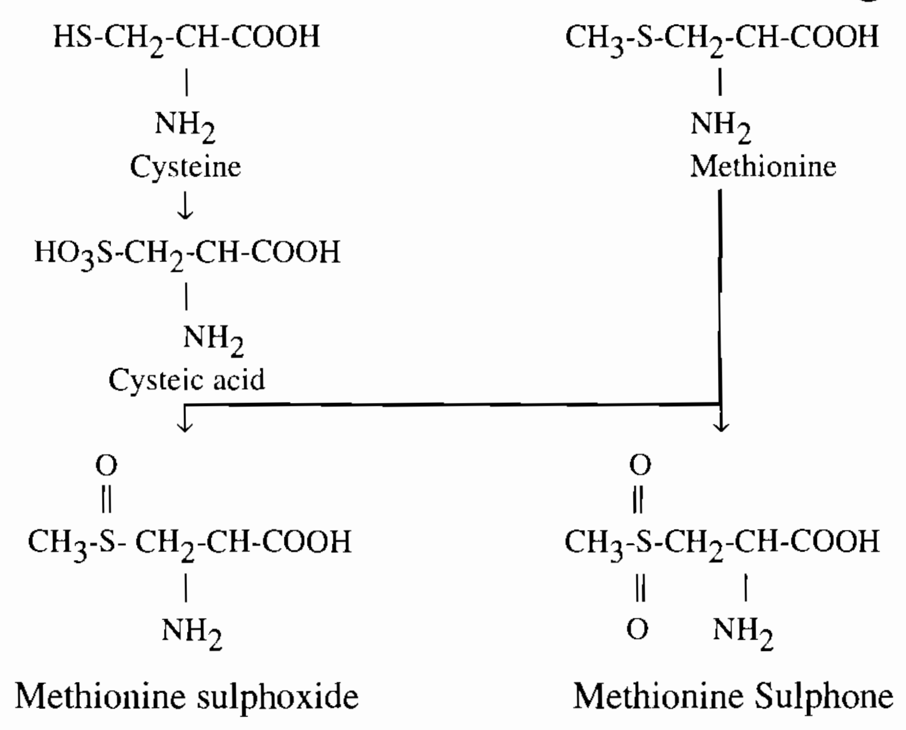
٣- يضاف مخلوط الأكسدة الى العينة مع الرج ثم يبرد الخليط الى درجة الصفر المئوى لمدة ١٦ ساعة.

٤- يضاف ٠,٨٥ جم ثنائى كبريتات الصوديوم Sodium disulfate ثم يرج.

٥- يجرى تحليل مائى للعينة باستخدام ٥٠ مل حمض HCl (٦ ع) يحتوى على ٥٠ مجم فينول تحت مكثف عاكس على درجة حرارة ١١٠°م لمدة ٢٤ ساعة.

٦- تضبط درجة حرارة حموضة الوسط الى ٢,٢ باستخدام محلول صودا كاوية (٧,٥ ع) ويرشح ناتج التحليل المائى من خلال مرشح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر.

يلاحظ : فى هذه الطريقة تحول الأحماض الأمينية سستئين- ميثيونين إلى حمض سستئيك Cysteic acid ومثيونين سلفون ومثيونين سلفواكسيد على التوالى:



والجدير بالذكر إن أنواع العينات التى يجرى لها تحليل مائى لمعرفة نوعية الأحماض الأمينية بصفة عامة تتضمن ما يلى:

أ- مصادر بروتينية نقية:

تشمل كل من الشعر (كيراتين)- الجلد (كولاجين- الإستين)- بروتينات محضرة بواسطة الهندسة الوراثية.

ب- الحبوب ومواد العلف:

وهى تحتوى على نسبة منخفضة نسبيا من البروتين ونسب مختلفة من المواد الكربوهيدراتية.

ج- النباتات والفطريات:

تحتوى على مدى واسع من الأحماض الأمينية مع كميات متفاوتة من البروتين.

د- الصخور والحفريات Fossils

حيث يظهر تحليل الأحماض الأمينية علاقة بعمر الصخور المتحولة Meta-morphic rocks

خامسا: تقدير الأحماض الأمينية في الطعام والأعلاف

أولا: الطرق الوصفية ونصف الكمية Qualitative & semiquantitative لتقدير الأحماض الأمينية:

تشمل هذه الطرق ما يلى:

أ – الكروماتوجرافى الورقى Paper chromatography

ب – كروماتوجرافى الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography

ج – طرق الهجرة فى المجال الكهربى Electrophoretic technique

د – طرق كيميائية بتكوين مشتقات للأحماض الأمينية.

٥-١- طرق الكشف عن الأحماض الأمينية (اللونية- الفلورة)

يوجد نوعان من الطرق الكيميائية للكشف عن الأحماض الأمينية وهما: الطرق اللونية وطرق الوميض (الفلورة).

أولاً: الطـــرق اللونيـــة:

تشمل هذه الطرق تفاعل الجوهر الكشاف باولى Diazotized sulphanilic acid (Pauly) مع الهستدين، التيروزين ويعطى ناتج ذو لون أحمر ويحدث هذا التفاعل أيضـا مع المركبات الفينوليـة الأخرى- يتفاعل الجوهر الكشاف ايرليش P-amino benzaldehyde (Ehrlich) فى حمض HCl مع التربتوفان وبعض الأندولات الأخرى ويعطى لون أزرق محمر، بينما يعطى هذا التفاعل لون أصفر مع الأمينات العطرية ومركبات اليوريا Ureides ولهذا يجب التخلص اولا من اليوريا الموجودة فى أغلب السوائل الحيوية.

ترجع أهمية الجوهر الكشافة سالفة الذكر فى تحديد أماكن الأحماض الأمينية المفصولة بواسطة طرق التحليل الكهربى وكذلك التحليل ذو الطبقة الرقيقة TLC.

يبين الجدول التالى الجواهر الكشافة المتخصصة فى التعرف على أحماض أمينية معينة.

الجوهر الكشاف	التركيب وظروف التفاعل	الأحماض الأمينية	اللون الناتج	ملاحظات
إيزاتين Isatin	٢ جم إيزاتين/ لتر اسيتون- التسخين على درجة ١٠٠° م لمدة ٢- ٣ دقيقة	برولين	أزرق غامق	غير متخصص- أساسى للكشف عن البرولين
		هيدروكسى برولين	أزرق/ أخضر	
		أسبارتيك	أزرق خفيف	
		جلوتاميك	بنى خفيف	
		آلانين	رمادى/ أزرق	
		فينايل آلانين	أزرق	
		تيروزين	أزرق/ رمادى	
		بيتا آلانين	أزرق فاتح	
		جلوتامين	أحمر فاتح	
إيرليش Ehrlich	١٠٠ جم بارا ثنائى ميثايل امينو بنزالدهيد/ لتر حمض HCl مركز- يخلط حجم واحد منه مع ٤ حجوم أسيتون- يتم التفاعل فى خلال ٢٠ دقيقة.	تريتوفان	قرنفلى/ أحمر	
		سيتروللين	أصفر	يتفاعل مع بعض الاندولات والامينات العطرية

(تابع) جدول الجواهر الكشافة المتخصصة فى التعرف على أحماض أمينية معينة.

باولى Pauly	٩ جم حمض سلفانيليك/ لتر حمض HCl مركز- يخلط حجم واحد منه مع ١٠ حجوم ماء، حجم واحد من نيتريت صوديوم (٥٠ جم/ لتر)، حجم واحد من كربونات صوديوم (١٠٠ جم/ لتر)	هستدين تيروزين	أحمر برتقالى فاتح	يتفاعل مع بعض الايميدازولينات والمركبات الفينولية وأملاح الأمونيوم
ثنائى الأسيتيل Diacetyl	١٠٠ جم ألفا نافثول/ لتر صودا كاوية (٨٠ جم/ لتر) + حجم مساو من ثنائى الأسيتيل (١ مل/ لتر ماء) يخلط قبل الاستخدام- يسخن على درجة ١٠٠°م لمدة ٢- ٣ دقائق.	ارجنين	بنفسجى/ أحمر	
نيتروبروسيد السيانيد Cyanide nitro prusside	تحضر المحاليل التالية بمعدل (١٠٠ جم/ لتر) صودا كاوية- نيتروبروسيد الصوديوم- حديدى سيانيد البوتاسيوم. يخلط حجم واحد من كل محلول سبق تحضيره بعد تخفيفه ٣ مرات بالماء وتترك لمدة ٣٠ دقيقة قبل الاستخدام - لا يحتاج التفاعل لتسخين.	سستئين سستئين هوموسستئين هوموسستئين	بنفسجى بنفسجى بنفسجى بنفسجى	تختفى الألوان بعد حوالى ٣٠ دقيقة

ثانيا: الطرق الفلورية

تفوق هذه الطرق فى حساسيتها وتخصصها على الطرق اللونية وفيما يلى الطرق الفلورية التى تستخدم فى التقديرات الكمية للأحماض الأمينية العطرية: تيروزين والفينايل آلانين

١- التيروزيـــــن

يتفاعل جوهر ١- نيتروزو ٢- نافثول 1- Nitrozo-2- naphthol مع التيروزين فى وجود نيتريت الصوديوم ليعطى مركب أحمر غير ثابت والذى يتحول بالتسخين فى وجود حمض النيتريك ليعطى مركب فلورى أصفر ثابت. وبعد التخلص من زيادة الجوهر الكشاف نيتروزونافثول يقدر المركب المفلور عند طول موجة ٥٧٠ نانومتر. وفيما يلى خطوات إجراء هذا التفاعل:

الجواهـــر الكشـــافة

١-١- نيتروزو - ٢- نافثول (٢ جم/ لتر إيثانول ٩٥ ٪) ٢ حجم.

٢- حمض نيتريك (٣ مول/ لتر) ٣ حجم.

٣- نيتريت صوديوم (٠,١ مول/ لتر) ٣ حجم.

تخلط هذه المكونات قبل الاستخدام مباشرة.

الطريقـــة:

١- يخلط ١٠ ميكرولتر من العينة مع ٢٠٠ ميكرولتر من الجوهر الكشاف نيتروزونافثول ويسخن على درجة ٣٣°م لمدة ٢٠ دقيقة.

٢- يضاف ١ مل ماء و ٣ مل ثنائى كلوريد الإيثيلين ويخلط ثم يجرى طرد مركزى.

٣- تزال الطبقة المائية العلوية ثم يترك ليحدث التفاعل على درجة حرارة الغرفة لمدة ٤٠ دقيقة.

٤- تقدر الفلورة فى خلال ٣٠ دقيقة عند طول موجة ٥٧٠ نانومتر بعد التهيج عند طول موجة ٤٦٠ نانومتر.

٢- الفينـــايل آلانيـــن

يتفاعل الفينايل آلانين مع النهيدرين فى وجود ببتيد ثنائى (عادة جليسيل- ليوسين أوليوسيل- آلانين) ليعطى مركب مفلور. ويمكن اسراع وتثبيت الفلورة باضافة محلول نحاس قلوى لضبط درجة حموضة الوسط (pH) الى ٥,٨ ويقدر المركب المفلور عند طول موجة انبعاث ٥١٥ نانومتر بعد الإثارة على طول موجة ٣٦٥ نانومتر.

الجواهـــر الكشـــافة

١- محلول منظم سكسينات Succinate buffer (٠,٣ مول/ لتر) ذو درجة حموضة (pH) ٥,٨.

٢- ننهيدرين (٣٠ ملليمول/ لتر).

٣- ليوسيل- آلانين (٥ ملليمول/ لتر) أو جليسيل- ليوسين.

٤- جوهر النحاس:

كربونات صوديوم (١,٦ جم/ لتر)- طرطرات صوديوم وبوتاسيوم (٦٥ جم/ لتر)- كبريتات نحاس (٦٠ مجم/ لتر).

الطريقـــة :

١- يسخن ٢٠ ميكرولتر عينة + ٢٠ ميكرولتر محلول منظم سكسينات+ ٨٠ ميكرولتر ننهيدرين + ٤٠ ميكرولتر محلول ببتيد ثنائى على درجة ٦٠°م لمدة ٢ ساعة ثم يبرد الى درجة ٢٠°م.

٢- يضاف ٢ مل من جوهر النحاس- تقدر الفلورة عند طول موجة انبعاث ٥١٥ نانومتر وإثارة على طول موجة ٣٦٥ نانومتر.

ثانياً: الطرق الكمية Quantitative

وتشمل الطرق التالية:

التحليل الكروماتوجرافى الغازى GLC- التحليل الكروماتوجرافى السائلى.

وقد تم التعرض الى هذه الطرق التحليلية فى كتاب «التحليل الكروماتوجرافى» لنفس المؤلف. وفى هذا الجزء تم اضافة الادمصاص الآيونى وهى من الطرق الشائعة لتحليل الأحماض الأمينية. وفيما يلى أهم الطرق المستخدمة فى تحليل الأحماض الأمينية.

٥-٢- التقدير الكمي باستخدام التحليل الكروماتوجرافي الغازي Gas-liquid chromatography

توجد صعوبات عند تحليل الأحماض الأمينية بواسطة الـ GLC حيث أن الأحماض الأمينية عبارة عن مركبات كيميائية غير متجانسة وليست متطايرة بالقدر الكافى. ويلزم تحويلها الى مشتقات متطايرة وقد تتكون مشتقات مختلفة بالنسبة للحمض الأمينى الواحد (أحادية وثنائية المشتقات) وبالتبعية لا تعطى مقدار كمى لكل حمض أمينى بالاضافة الى صعوبة تكوين هذه المشتقات وتأخذ

وقتا طويلا للحصول عليها. والصعوبات فى الفصل لا ترجع فقط الى اختيار الطريقة لتكوين مشتقات بل ترجع أيضا الى اختيار الطور الثابت القادر على فصل مشتقات الأحماض الأمينية ذات التركيب الكيميائى المتشعب Diverse group of compounds . وأيضا من ضمن المشاكل فى فصل الأحماض الأمينية هو اختيار الكاشف Detector المناسب حيث عادة ما يستخدم كاشف (FID) الغير متخصص.

وفيما يلى مشتقات الأحماض الأمينية المناسبة للفصل الكروماتوجرافى الغازى.

المشتق	الرمز
N-TMS-TMS-ester	TMS-NCHR-COO-TMS
N-TMS-n-butyl ester	TMS-NH-CHR-$COOC_4H_9$
TFA-n-butyl ester	CF_3-CO-NH-CHR-$COOC_4H_9$
HFB-n-propl ester	C_3F_7-CO-NH-CHR-$COOC_3H_7$

وتمتاز طريقة تكوين المشتقات TMS بسهولة اجراء الطريقة، حيث يضاف المركب Bistrimethyl sily1 (trifluoro acetamide) فى الأسيتو نتريل والتسخين لمدة ساعتين على درجة ١٥٠° م فى ظروف جافة فى أنبوبة مغلقة Sealed tube. ومن الطرق الشائعة هو تكوين استرات البيوتايل للحمض الأمينى ويعقبه TMS. أو مشتقات ثلاثى فلوروأسيتيل TEA أو سباعى فلورو بيوتايل HFB لمجموعة الأمين بالتفاعل مع TAF أو HFA فى ثنائى كلوريد الميثلين على التوالى لمدة ٥ دقائق على درجة ١٥٠°م. واستخدمت بكثرة المشتقات n-HFB propylesters فى معرفة نوعية الأحماض الأمينية فى الأجهزة التى

Esterification and Trifluoroacetylation of Amino Acids

1. $R{-}CH(NH_2){-}C(=O){-}OH \xrightarrow[\text{20°C, 30 Minutes}]{CH_3OH + 1{,}25\ \text{Eqv. HCl}} R{-}CH(NH_3^+Cl^-){-}C(=O){-}O{-}CH_3$

2. $R{-}CH(NH_2){-}C(=O){-}O{-}CH_3 \xrightarrow[\text{100°C, 2,5 hours}]{n{-}C_4H_9OH + 1{,}25\ \text{Eqv. HCl}} R{-}CH(NH_3^+Cl^-){-}C(=O){-}O{-}C_4H_9$

3. $R{-}CH(NH_3Cl){-}C(=O){-}O{-}C_4H_9 \xrightarrow[\text{Pressure tube, 150°C, 5 Minutes}]{(F_3C{-}CO)_2)} R{-}CH(NH{-}C(=O){-}CF_3){-}C(=O){-}O{-}C_4H_9$

b)

1. $R{-}C(NH_2){-}C(=O){-}OH \xrightarrow[\text{after 15 Sec. Ultrasonic Mixing, 15 Minutes at 100° C}]{n\,C_4H_9OH + 3\ \text{Eqv. HCl}} R{-}C(NH_3^+Cl^-){-}C(=O){-}O{-}C_4H_9$

تستخدم أعمدة شعرية وكاشف electron capture وكذلك حالة تحويل الأحماض الأمينية الى مركبات متطايرة كحولية فى وسط حمضى لتكوين استر ويعقب ذلك اجراء أسئلة لمجموعة الأمين باستخدام عديد من أندريدات الأحماض (أنظر صفحة ٥٣).

والجدول التالى يبين الجواهر المختلفة المستخدمة لتكوين مشتقات الأحماض الأمينية.

الجواهر الكشافة لتكوين استر	الجواهر الكشافة لأسئلة الأمين
3N HCl/iso - propanol or isobutanol	N-methyl–N-(tert-butyl dimethyl silyl) trifluoroacetamide-
3N HCl/Normal butanol	- Pentafluoropropionic anhydride
3N HCl/Normal propanol	- Trifluoroacetic anhydride
3N HCl/Methanol	-Heptafluorobutyric anhydride
3N HCl/Iso amyl alcohol	

٥-٣-مشتقات الأحماض الأمينية للفصل الكروماتوجرافي السائلي HPLC

يلاحظ أن الأحماض الأمينية العطرية تمتص الأشعة فى منطقة الـ UV (٢٥٠– ٢٨٠ nm)، وأن التريبتوفان له خواص الفلورة (تهيج عند ٢٩٥ nm وانبعاث عند ٣٤٥ nm) إلا أن غالبية الأحماض الأمينية ليس لها امتصاص أو فلورة أو لها تفاعلات كيميائية مميزة. بالإضافة إلى ذلك، فإنها غير متطايرة بدرجة كافية لتحليلها بواسطة GC، ولذلك لابد من عمل مشتقات لتحقيق هدفين:-

١- سهولة الكشف عنها (إدخال كروموفور أو فلوروفور).

٢- تحويل الأحماض الأمينية الى مشتقات متطايرة.

تكوين مشتقات سهل الكشف عنها

تستخدم هذه الطريقة بصفة أساسية عند فصل الأحماض الأمينية والكشف عنها بواسطة HPLC. وتوجد ثلاثة أنواع أساسية من الكواشف للكشف عن الأحماض الأمينية وهى كاشف الأشعة فوق البنفسجية والضوء المرئى (V,UV) وكاشف الفلورة والكاشف الكهروكيميائى electrochemical.

والكواشف التى تعتمد على الامتصاص والفلورة هى الشائعة والأكثر شيوعا هو الكاشف UV.

المشتقات التي تستخدم في طريقة Post column

٥-٣-١- النتهيـــدرين Ninhydrin (Nin)

وهو من الجواهر الكشافة الهامة والتى تكون كروموفور بنفسجى Purple chromophore مع الأحماض الأمينية الأولية ويعطى كروموفور أصفر مع الأحماض الأمينية الثانية Secondary وهى البرولين والهيدروكسى برولين.

ويحدث الامتصاص للكروموفورات عند أطوال موجية ٥٧٠ نانومتر (أولية) و٤٤٠ نانومتر (ثانية). وتصل حساسية هذا التفاعل إلى ١٠ بيكومول لأى حمض أمينى وهو مناسب فى التحليلات الروتينية.

والتفاعل يشمل الخطوات التالية:-

١- أكسدة مصحوبة بفقد مجموعة الكربوكسيل للحمض الأمينى وانتاج ننهيدرين مختزل وأمونيا وثانى اكسيد كربون.

٢- يتفاعل النتهيدرين المختزل مع النتهيدرين والأمونيا الناتجة.

٣- يتكون معقد لونى أزرق.

اولا: تفاعل النينهيدرين مع الأحماض الأمينية الأولى

NINHYDRIN REACTION

NINHYDRIN + AMINO ACID → HYDRINDANTIN + RCHO + CO_2 + NH_2

NINHYDRIN + HYDRINDANTIN + NH_2 → RUHEMANN'S PURPLE + $3H_2O$

ϵ_{max} = 570 nm

ثانيا: تفاعل النينهيدرين مع الأحماض الأمينية الثنائية

NINHYDRIN AND PROLINE

NINHYDRIN + PROLINE →

$\xrightarrow{CO_2}$ $\xrightarrow{NINHYDRIN}$

ϵ_{max} = 440 nm

يتفاعل الحمض الأمينى مع النتهيدرين (Triketo hydrindene hydrate) بالتسخين فى وسط حمضى (درجة حموضة "pH" ٣– ٤) وينتج امونيا وثانى أكسيد كربون ومعقد ذو لون بنفسجى. وعادة يتكون جوهر كشاف النتهيدرين من ننهيدرين (٢,٥ جم) و 2,4,6-collodine (٣٧ مل) وايثانول (١٧٥٠ مل) وحمض خليك ثلجى (٣٧ مل). وبصفة عامة يتكون الجوهر الكشاف النتهيدرين مما يلى:

١ – **المذيب:** إيثلين جليكول أو ثنائى ميثايل سلفوكسيد أو ميثايل سيللوسولف.

٢– **المحلول المنظم:** خلات الصوديوم أو البوتاسيوم تختلف فى درجة الحموضة والتركيز.

٣– **مسحوق النتهيدرين.**

٤ – **مادة مختزلة:** ثلاثى كلوريد التيتانيوم أو كلوريد القصديروز أو هيدرنداتين.

ويستخدم هذا التفاعل فى التقدير الكمى للأحماض الأمينية. تعطى الأمينات والأحماض الأمينية غير الألفا تفاعل لونى مع النتهيدرين بدون إنتاج CO_2، وعلى ذلك تتفاعل الأحماض الأمينية بيتا، جاما، دلتا، ايبسيلون والببتيدات ببطء بالمقارنة مع الأحماض الأمينية الألفا وتعطى معقد ذو لون أزرق، بينما تتفاعل الأحماض الإيمينو ويتكون معقد ذو لون أصفر يمكن تقديره عند طول موجة ٤٤٠ نانومتر.

والجدول التالى يبين لون المعقد الناتج مع الأحماض الأمينية المختلفة:

الحمض الأمينى	لون المعقد
هستيدين	بنى
فينايل آلانين	بنى/ رمادى
جليسين	أزرق
جلوتاميك	أزرق واضح
ليسين	رمادى/ أزرق
تيروزين	رمادى
برولين	برتقالى
هيدروكسى برولين	برتقالى
أسبارتيك	برتقالى/ أصفر

٥-٣-٢- أورثو فيثالدهيد Ortho- phthaldehyde (OPA)

وهو الجوهر الكشاف الثانى الشائع الإستخدام. ويمكن استخدامه فى كل الطريقتين Pre-colum و Post-colum، وفيه تتفاعل مجموعة الثيول Thiol مع الأحماض الأمينية الأولية فى وجود مادة مختزلة قوية (mercapto etha-nol 2-) على درجة حموضة (pH) ٩– ١١ وتعطى مركب مفلور (أقصى طول موجة تهيج ٣٤٠ nm وأقصى طول موجة انبعاث ٤٥٥ nm) ولهذا فإنه يعتبر مناسب جداً فى الفصل فى الـ post-column.

بالإضافة إلى ذلك، فهو أكثر حساسية بالمقارنة بالننهيدرين. ووجد نظرياً أن حساسيته تساوى ١٠٠ مرة ولكن من الناحية العملية Practical يحدث انخفاض فى الحساسية. ومن أهم عيوب هذا الجوهر الكشاف أنه لا يتفاعل مع البرولين والهيدروكسى برولين ولاجراء التفاعل يلزم أولا التفاعل مع مادة مؤكسدة مناسبة مثل كلورامين– ت (Sodium N-chloro- P-toluene-sulfon amide)

Chloramin T أو هيبوكلوريت الصوديوم لتحويلها إلى مركبات يمكن أن تتفاعل مع الجوهر الكشاف. كذلك فإنه يلزم أكسدة السستئين والسستين لأن مجموعة الثيول تتفاعل مع الأمين فى هذا الجوهر الكشاف، لذلك فان السستئين يدخل منافساً لاحتوائه على الثيول فى خلال التفاعل.

والجوهر الكشاف المائى ثابت على درجة حرارة الغرفة ويحدث التفاعل بسرعة بدون حرارة، وهذه الطريقة حساسة وهى تعادل أكثر من ١٠ مرات فى الحساسية بالمقارنة بالتفاعل مع النِنهيدرين.

$$\text{OPA} + R\text{-}NH_2 + R'\text{-}SH \xrightarrow[0.1\text{-}1\ \text{min}]{\text{Rm. temp}} \text{Isoindole (S-R', N-R)} + 2\,H_2O$$

OPA (CHO, CHO) p-amine Thiol

Isoindole
Ex 230 or 340 nm
Em 416 – 700 nm

٥-٣-٣- فلوروسكامين Fluoro scamine

تتفاعل جميع الأمينات الأولية مع فلوروسكامين فى وسط قلوى (درجة حموضة "pH" ٩– ١١) لتكوين مركب مفلور (أقصى طول موجة تهيج ٣٩٠ nm وأقصى طول موجة انبعاث ٤٧٥ nm) والمادة المفلورة غير ثابتة فى الوسط المائى، ولذلك يجب أن يحضر الجوهر الكشاف فى الأسيتون. لا تتفاعل الأمينات الثنائية والبرولين والهيدروكسى برولين مع الجوهر الكشاف إلا فى حالة تحولها إلى أمينات أولية بالتفاعل مع N-Chloro-succinimide. ويمتاز هذا التفاعل بأنه يحدث بسرعة مع الأحماض الأمينية على درجة حرارة الغرفة ولكن حساسيته ليست أعلى من النِنهيدرين.

Primary amine + Fluorescamine (non-fluorescent) ⟶ Fluorescent product

٥-٣-٤ فلوروثنائي نيتروبنزين Fluoro- 2,4- dinitrobenzene (FDNB)

يتفاعل هذا الجوهر الكشاف فى محلول قلوى (درجة حموضة ٩,٥) مع مجموعة أمين حرة أو حمض أمينى أو ببتيد ليتكون مشتق ثنائى نيتروفينايل (DNP) أصفر اللون. ولا يستخدم هذا التفاعل فى تقدير الأحماض الأمينية كميا لأن أقصى امتصاص لمشتقات ثنائى نيتروفينايل تختلف باختلاف نوعية الحمض الأمينى، ولذلك تستخدم فقط فى التحليل الوصفى عن طريق مقارنة R_f للأحماض الأمينية القياسية مع الأحماض الأمينية بالعينة بعد فصلها بواسطة التحليل الكروماتوجرافى الورقى وذو الطبقة الرقيقة.

تفاعل فلورو ثنائي نيتروبنزين FDNB

الجوهر الكشاف: محلول FDNB (٠,٢٥ مل) وكحول إيثايل مطلق (٤,٧٥ مل).

الطريقة: وزن العينة (٢ مجم) + ماء مقطر (٠,٢ مل) + محلول بيكربونات صوديوم (٤٢ جم/ لتر- ٠,٠٥ مل) + الجوهر الكشاف (٠,٤ مل).

بعد الرج يترك التفاعل لمدة ساعة. ويجب أن يظل الوسط قاعدى (pH = ٨- ٩) وذلك بإضافة محلول بيكربونات الصوديوم.

يضاف ماء مقطر (١ مل) ومحلول بيكربونات صوديوم (٤٢ جم/ لتر- ٠,٠٥ مل).

يستخلص المستحلب ثلاث مرات بحجوم متساوية بالإثير للتخلص من الجوهر الكشاف الزائد. يضبط درجة حموضة وسط التفاعل (pH = ٩) باستخدام HCl (٦ مول/ لتر) ثم يستخلص المشتق من المحلول بالاثير ٣ مرات، ٢ مل كل مرة. تجمع المستخلصات وتبخر للجفاف ثم يذاب المتبقى فى ٠,٥ مل أسيتون ويستخدم للفصل بالطرق الكروماتوجرافية.

$$O_2N-C_6H_3(NO_2)-F + NH_2-CH(R)-COOH \longrightarrow O_2N-C_6H_3(NO_2)-NH-CH(R)-COOH + HF$$

FDNB — Amino acid — Yellow-coloured derivative

فيما يلي الجواهر شائعة الاستخدام في طريقة Pre-column

١- أورثوفيثالدهيد OPA

سبق أن تحدثنا عنه فى نظام Post-column وعيوب استخدامه.

٥-٣-٥- فينايل أيزوثيوسيانات Pheny Iso Thio Cyanate (PITC)

يطلق على هذا الجوهر الكشاف جوهر Edman إدمان والذى يستخدم فى معرفة تتابع الأحماض الأمينية فى الببتيدات والبروتينات. ويعطى عند تفاعله مع الأحماض الأمينية فى الببتيدات والبروتينات والأحماض الأمينية الحرة

مشتقات تسمى Phenyl Thio Carbamyl (PTC) ومن أهم عـيـوب هذا الجوهر:-

١- احتمال تكوين مشتقات مختلفة مع الليسين.
٢- حساسيته منخفضة مع السستئين.
٣- حساس للماء والأملاح.
٤ - يتأثر التفاعل بالمواد المصاحبة مع العينة (أمونيا- سكرات).
٥- لابد من خطوة الاستخلاص.
٦- تحتاج لوقت طويل لإجراء المشتق مع مهارة فى العمل.

يجرى الكشف فى منطقة الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجى ٢٤٥ نانوميتر وحساسيته أفضل من التفاعل مع الننهيدرين.

$$C_6H_5-N=C=S + NH_2-\underset{R}{CH}-COOH \longrightarrow C_6H_5-NH-\overset{S}{\overset{\|}{C}}-NH-\underset{R}{CH}-COOH$$

Phenylisothiocyanate Thiourea derivative

٥-٣-٦- فينايل ثيوهيدانتوين Phenyl Thio Hydantoin (PTH)

وهذا التفاعل له نفس العيوب كما فى حالة تكوين مشتقات PITC بالإضافة إلى عدم ثبات مشتقات الثريونين والسيرين. ويتم الكشف عن هذه المشتقات فى منطقة الأشعة فوق البنفسجية. يمكن تحويل مشتقات فينايل ثيوكاربيل للأحماض الأمينية إلى التركيب الحلقى فينايل ثيوهيدانتوين. وحساسية هذا التفاعل أقل بمقدار ٥ مرات عن النهيدرين.

٥-٣-٧- فلورينيل ميثوكسي كاربونيل كلوريد

Fluorenyl Methoxy Carbonyl Chloride (FMCC)

يستخدم هذا التفاعل فى حماية مجاميع الأمين عند تخليق الببتيدات. ومن أهم عيوب هذه الطريقة هو عدم دقة تقدير الهستدين نظراً لعدم ثبات مشتق FMCC-His وتكوين مشتقات مختلفة، كما يحتاج الأمر إلى خطوة استخلاص للتخلص من كمية الجوهر الكشاف الزائدة غير الداخلة فى التفاعل. ويتم الكشف بواسطة الفلورة (تهيج عند طول موجى ٢٦٠ نانوميتر وانبعاث عند ٣٠٥ نانوميتر) وتصل الحساسية الى ٢٠ فيكومول 20 fmol.

٥-٣-٨- دانسيل كلوريد Dansyl chloride (DANS-CI)

يتفاعل كلوريد Dimethylaminonaphthalene 5-sulfonyl chloride الدانسيل مع مجاميع الأمين الحرة فى وسط قلوى (pH ٩,٥ – ١٠,٥) لتكوين مشتقات لها خواص فلورة قوية (انظر المعادلات). تكشف هذه الطريقة عن كميات قليلة جدا من الأحماض الأمينية تصل الى أقل من واحد نانومول من الحمض الأمينى. ويلاحظ أن مشتقات الدانسيل للأحماض الأمينية تقاوم بدرجة كبيرة جدا التحليل المائى، لذلك تستخدم فى تحديد أماكن الأحماض الأمينية بعد فصلها بالطرق الكروماتوجرافية باستخدام لمبة الأشعة فوق البنفسجية.

وفيما يلى خطوات تفاعل كلوريد الدانسيل:

١– يخلط فى أنابيب صغيرة ما يلى: ١٠ ميكرولتر حمض أمينى (واحد ملليمول/ لتر)، ١٠ ميكرولتر محلول كربونات صوديوم (٠,٤ مول/ لتر)، ٢٠ ميكرولتر محلول كلوريد الدانسيل (٢٥ مجم/ لتر أسيتون).

٢– تغطى الأنابيب وتحضن على درجة ٣٧°م لمدة ساعة.

Dansyl Chloride + Amino Acids → Dns-Amino Acids

HCl, Δ, 60-100° C, 2-60 min.

تفاعل كلوريد الدانسيل مع المركبات المحتوية على مجموعة أمين حرة يعطى هذا التفاعل مشتقات مفلوره مع الأحماض الامينيه وكذلك مع مجموعة الأمين الطرفية للببتيدات فى الوسط القلوى.

٣- تؤخذ كمية من مخلوط التفاعل (٥ ميكرولتر) وتفصل بواسطة التحليل الكروماتوجرافى ذو الطبقة الرقيقة TLC باستخدام طور متحرك: كلوروفورم- كحول أمايل رباعى- حمض خليك ثلجى (٧٠: ٣٠: ٣٠).

٤- يكشف عن أماكن الأحماض الأمينية المفصولة باستخدام لمبة الأشعة فوق البنفسجية.

ومن أهم عيوب هذه الطريقة هو بطء التفاعل بين الجوهر الكشاف والحمض الأمينى.

٥-٣-٩- كلوريد الدابسيل Dabsyl chloride (DABS-CI)

Dimethylaminoazobenzenesulfonyl chloride

هذه الطريقة لها نفس العيوب السابق ذكرها وهى غير شائعة الاستخدام.

يكشف عن مشتقات الدابسيل فى المنطقة المرئية من الضوء وحساسيتها حوالى ١ بيكومول 1 p mol.

$$HN\text{-}R_2 + (CH_3)_2N\text{-}C_6H_4\text{-}N{=}N\text{-}C_6H_4\text{-}SO_2Cl \longrightarrow (CH_3)_2N\text{-}C_6H_4\text{-}N{=}N\text{-}C_6H_4\text{-}SO_2\text{-}NR_2$$

Dabsyl chloride

توجد طريقتان أساسيتان تعتمدان على مكان تكوين المشتقات، أى تكوين المشتقات قبل فصل الأحماض الأمينية عن بعضها البعض باستخدام العمود أو تكوين المشتقات للكشف عن الأحماض الأمينية بعد فصلها بواسطة العمود (انظر صفحة ٦٦) لذلك:

تسمى الطرق التى تعتمد على تكوين المشتقات قبل استخدام العمود باسم Pre-column

والمشتقات الشائعة هى OPA, FMOC, PITC

وتسمى الطرق التى تعتمد على تكوين المشتقات بعد استخدام العمود باسم Post-column

والمشتقات الشائعة هى النهيدرين و OPA وفلورسكامين.

يمتاز الفصل باستخدام طريقة Pre-column مقارنة بطريقة Post-column بالحساسية العالية، وقت التحليل قصير، ولا توجد اى صعوبات بالنسبة لكمية العينة المراد تحليلها (الطعام أو مواد العلف).

وأهم عيوبها هى:-

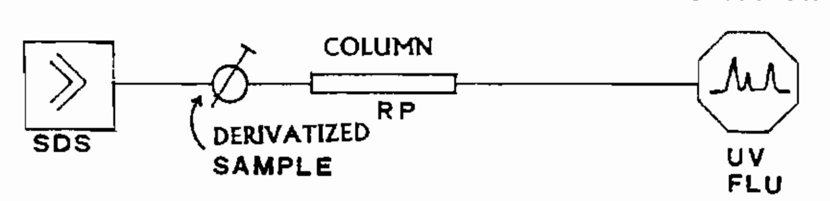
١- تكشف فقط عن الأحماض الأمينية الأولى Primary.
٢- صعوبة تكوين المشتقات.
٣- تداخل الكشاف أو النواتج الثانوية مع التقدير الكمى.
٤- عدم ثبات المشتقات المزدوجة Double derivatives.
٥ - تحضير المشتق لا يكون كميا دائما.

ومن جهة أخرى فان تقدير الأحماض الأمينية بطريقة Post لها عيوب وهى:-

١- وقت التحليل طويل.
٢ - حساسيتها أقل.

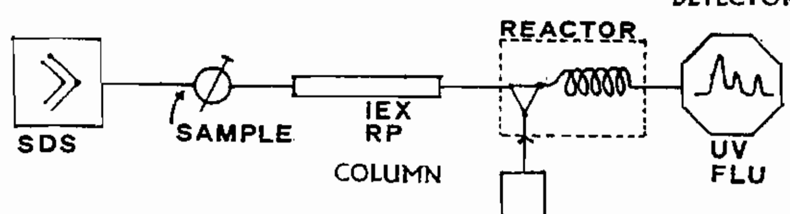
DERIVATIZATION PROCEDURES: طرق إجراء المشتقات

PRE-COLUMN



REVERSED PHASE - RP DANSYL
- RP OPA
- RP PTH

POST-COLUMN



ION-EXCHANGE - IEX NINHYDRIN
ION-EXCHANGE - IEX OPA
REVERSED PHASE - RP OPA

مقارنة بين الطرق الشائعة لتقدير الأحماض الامينية بواسطة HPLC

وجه المقارنة	Pre-Column		Post-Column	
	OPA	Dansyl	OPA/Na OCL	Ninhy drin
الدقة	*	*	جيد	جيد
وقت التحليل (دقيقة)	٥ – ٦٠	٢٠ – ٦٠	٣٠ – ٨٠	٣٠ – ٨٠
الحساسية (p-mol)	١ – ١٠	١ – ١٠	٥٠	١٠٠
كفاءة الفصل	**	**	جيد	جيد
تقدير الأحماض الامينية الثانية	لا	نعم	نعم	نعم
صعوبات أخرى	تكون مشتقات غير ثابتة	تكون مشتقات عديدة للحمض الامينى	--	--

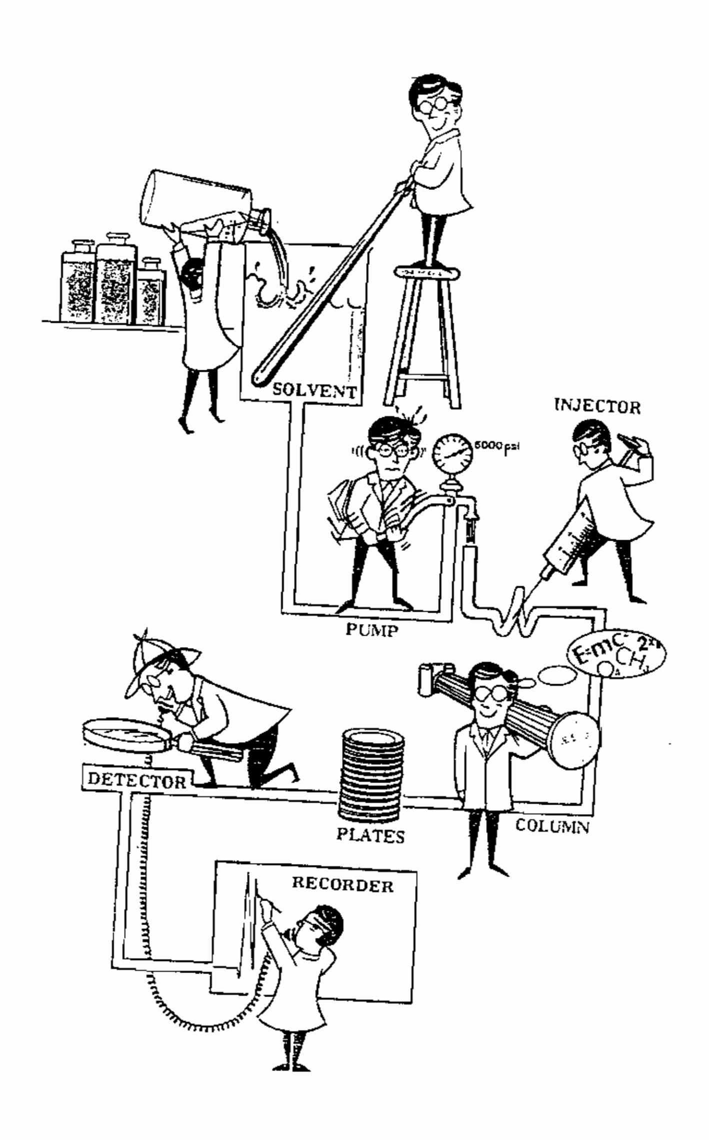
سادساً: التحليل الكروماتوجرافي السائل Liquid Chromatography

يرجع تاريخ الكروماتوجرافى الى عام ١٩٠٣ حين أجرى العالم الروسى M.Tswell تجاربه على فصل صبغات الكلوروفيل باستخدام عمود يحتوى على مسحوق الطباشير. ومضت حقبة من الزمن تم خلالها التغلب على مشكلتى: السرعة وكفاءة الفصل حيث تمكن العالمان Martin & Synge الحاصلان على جائزة نوبل عام ١٩٤٠ من وضع الأساس النظرى لميكانيكية الفصل الكروماتوجرافى الغازى وبذلك مهدا الطريق الى حدوث تطورات كبيرة من جهة الأجهزة والنظريات الخاصة بالتحليل الكروماتوجرافى الغازى ونتيجة لذلك ظهرت أجهزة التحليل الكروماتوجرافى السائل والتى تعتمد على استخدام طور متحرك سائل بدلا من الغاز– وفى البداية كانت أجهزة التحليل الكروماتوجرافى السائل غير دقيقة ثم تبع ذلك تحسينات تكنيكية سواء فى المضخات ذات الضغط العالى –المواد المعبأة– الكشف عن مكونات العينة.

يعتبر HPLC أحد الطرق الأساسية لتحليل العديد من المواد العضوية. وهو يمتاز مثل طرق التحليل الكروماتوجرافى الأخرى بالدقة والحساسية العالية كما أن مدى استخداماته لا تعتمد على تطاير العينة أو تأثرها بدرجة الحرارة كما هو الحال فى GLC ويمتاز جهاز HPLC بكفاءته العالية جدا بالإضافة إلى إستخدامه فى فصل العديد من المركبات المختلفة.

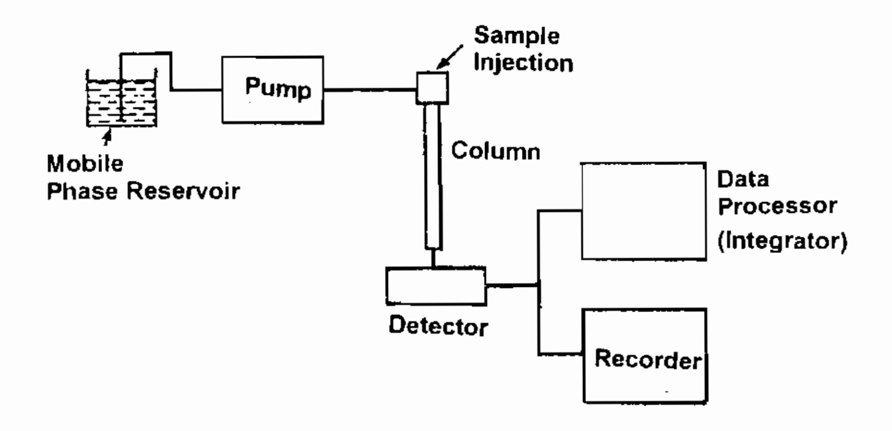
٦-١- أساسيات: Principles of HPLC

يتكون جهاز الكروماتوجرافى السائل من: مضخة– الحقن– العمود– الكاشف– المسجل. ويعتبر العمود هو قلب النظام. ويتكون الطور الثابت من جزيئات ذات حجم ميكرونى (micron size, 10^{-6} M) لذلك يحتاج الفصل الى مضخة ذات ضغط عال لدفع الطور المتحرك داخل العمود.

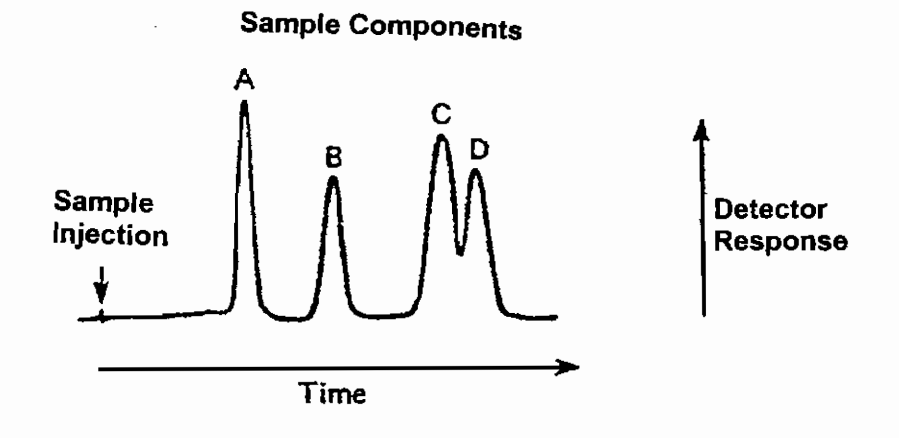


التحليل الكروماتوجرافى السائل

Liquid Chromatography



الأجزاء الرئيسية لجهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل



كروماتوجرام يبين فصل مكونات العينة

يقوم جهاز HPLC بفصل مكونات العينة ثم التعرف عليها وتقديرها كميا. ويتم الفصل عن طريق توزيع العينة ما بين طورين أحدهما طور متحرك والآخر طور ثابت سائل أو صلب. وعادة يكون الطور الثابت فى عمود طوله حوالى ٢٥سم وقطره الداخلى ٤مم وتعتمد كفاءة الفصل على مواصفات العمود وبصفة خاصة على قطر جزيئات المادة المعبأة ويلاحظ أن خفض قطر الجزيئات يؤدى إلى تحسين أداء العمود ومن ناحية أخرى يرفع الضغط للحصول على معدل سريان مناسب للطور المتحرك خلال العمود ولهذا السبب فإن أجهزة HPLC الحديثة يعبر عنها بالضغط العالى للكروماتوجرافى السائل.

وبغض النظر إذا كانت المادة المعبأة ذات حجوم واحدة Uniform فإنه يتطلب ضغط عالى نسبيا لتعطى معدل السريان المطلوب وهو ٣ مل/ دقيقة فإذا كان العمود أبعاده ٢٥ × ٤ مم ومعبأة بجزيئات قطرها ١٥ ميكرومتر فإنه يتطلب حوالى ٣٠ ضغط جوى للحصول على معدل سريان ١ مل/ دقيقة من الهكسان والى ضغط جوى مقداره ٥٠ للحصول على معدل سريان مشابه للمذيبات الأكثر لزوجة مثل الماء والشكل فى صفحة (٧٠) يبين الأجزاء الرئيسية لجهاز HPLC. تدفع المضخة الطور المتحرك داخل عمود الفصل ثم يمر خلال الـ Detector فإنه يحدث تغير فى الإشارات الكهربائية حيث تسجل على خريطة متحركة لتعطى كروماتوجرام (صفحة ٧٠).

وبصفة عامة تبدأ العملية الكروماتوجرافية بحقن مكونات المخلوط Solutes فى قمة العمود- يحدث الفصل بعد دفع المخلوط والطور المتحرك داخل العمود وأخيرا ينفصل كل مكون من مكونات المخلوط على حدة من العمود- يكشف عن المركبات المفصولة سواء بكاشف عام universal أو خاص specific معتمدا على خواص مكونات العينة التى يجرى تقديرها. تظهر إستجابة الكاشف Detec- tor response نتيجة لوجود أى مكون على ورقة المسجل Chart recorder

والذى يسمى بالكروماتوجرام. ولجمع وتخزين وتحليل النتائج الكروماتوجرافية فإنه يلزم وجود حاسب آلى Computer مرتبطا مع المسجل. والجدير بالذكر أن كاشف الكروماتوجراف يعطى إشارات Signals تظهر على شكل Peaks ذو شكل ناقوسى Bell shaped والذى يمثل تركيز المكون المفصول.

يمتاز الكروماتوجرام بالآتى :-

١- الوقت الذى يأخذه أى مركب يمر خلال العمود تحت ظروف موحدة يكون ثابتا ويسمى Retention time ومقارنة أرقام الـ Retention times مع المواد القياسية يعطى وسيلة للتحليل الوصفى.

٢- تتناسب المساحة تحت كل Peak فى الكروماتوجرام تناسبا طرديا مع تركيز المكون فى العينة وبالتالى فإن التحليل الكروماتوجرافى السائل يمكن استخدامه فى التقدير الكمى.

٦-٢- تركيب جهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل:-

(١) المضخـــة Pump

الشروط الواجب توافرها فى جهاز ضخ المذيبات كما يلى:-

أ - تعطى مقدرة على ضخ المذيب بمعدل صفر- ١٠ مل/ دقيقة.

ب - الحجم الداخلى أقل ما يمكن بحيث يعطى معدل سريان للطور السائل ثابتا سواء عند مقدمة المضخة أو عند بداية العمود.

جـ - يجب أن تكون النبضات (معدل السريان/ الضغط) أقل ما يمكن حيث أن ثبات معظم أنواع الـ Detectors يتناسب عكسيا مع النبضات Pul-sation.

د- ذات قوة ضغط عالى تعطى سريان عالى للطور المتحرك خلال الأعمدة والضغط المطلوب يعتمد على لزوجة المذيب وحجم جزيئات المادة المعبأة بالإضافة إلى أبعاد العمود.

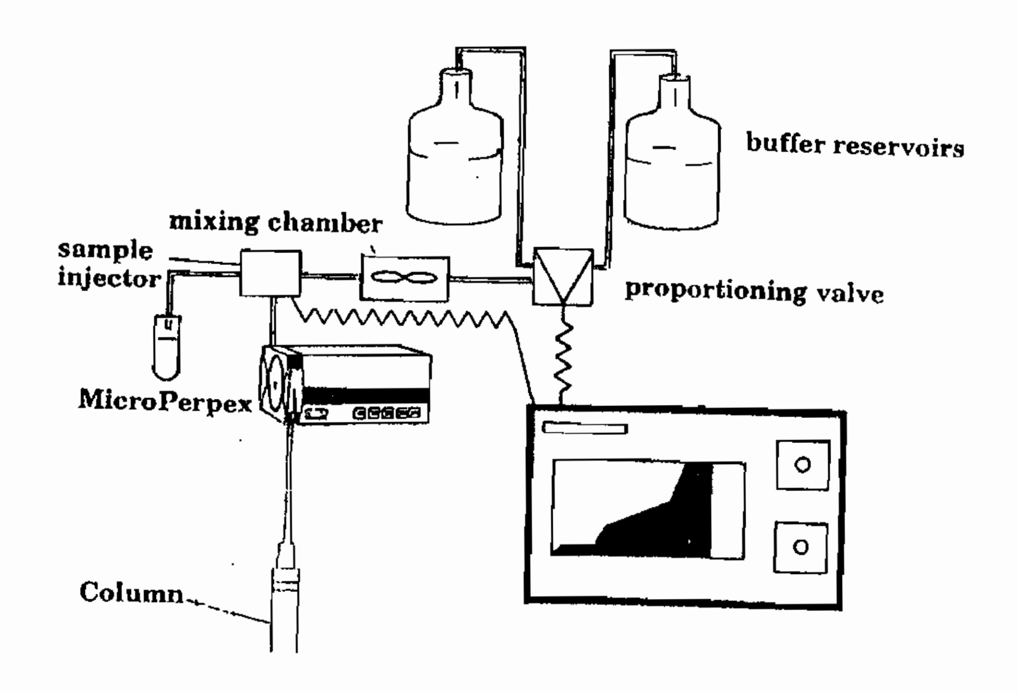
ولمنع نبضات الضغط فإنه يستعمل مضخة ذات مكبسين Dual Pistons بحيث يكون أحدهم دائما فى مرحلة الضغط والآخر فى مرحلة الملأ Refill.

الإستخلاص التدريجي: Gradient Elution

فى بعض تطبيقات التحليل الكروماتوجرافى السائل HPLC يجب تغيير تركيب الطور المتحرك بطريقة محكمة ويسمى هذا التكنيك بالإستخلاص التدريجى ويبدأ الإستخلاص التدريجى بإستعمال طور متحرك معين واحد ثم يضاف إليه تدريجيا كميات متزايدة من المذيب الثانى خلال التحليل والتغيير المطلوب فى التركيب إما أن يكون زيادة خطية فى تركيز المذيب الثانى مع الوقت أو تركيب معقد (انظر صفحة ٧٤) توجد طرق متعددة لتغيير تركيب المذيب خلال عملية الاستخلاص التدريجى فبإستخدام مضخة لها مكبس ذو حركة ترددية Reciprocating Piston Pump تخلط المذيبات بعد خروجها من المضخة Down Stream بواسطة صمام توزيع Proportioning Valve ويوجد صمام تحكم Controller يعطى البروجرام المطلوب فى تغيير المذيب أثناء الفصل (انظر صفحة ٧٤).

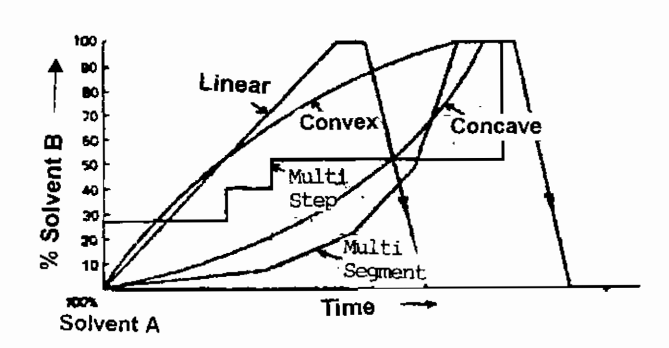
حقن العينات: Sampling

توضع العينة داخل العمود إما بواسطة محقن Syringe أو بواسطة صمام حقن والمحاقن المستخدمة عادة فى GLC لا تصلح فى حالة الضغط العالى للتحليل الكروماتوجرافى السائل وتوجد محاقن خاصة للـ HPLC وصمامات



جهاز يبين الاستخلاص التدريجى

الحقن لها القدرة على الحقن عند الضغط العالى وهى أيضا تحقن حجوم مضبوطة Reproducible.



برامج الاستخلاص التدريجى

الأعمـــدة: Columns

إن أبعاد العمود فى جهاز HPLC هى ٢٥ x ٤مم وتصنع الأعمدة أحيانا من الزجاج وعادة تستعمل أعمدة مصنوعة من الصلب Steel نظرا لضغط الطور المتحرك العالى ويجب أن يكون الجدار الدخلى للأنبوبة المكونة للعمود ناعمة Smooth ويجب أن تكون المسافة ما بين العمود والـ Detector أقل ما يمكن لمنع استعراض الـ Peak ويتم التحليل بواسطة HPLC فى درجة حرارة الغرفة ولكن فى بعض الحالات فإنه من المرغوب أن تكون حرارة العمود مرتفعة ولذلك تستخدم أعمدة ساخنة حيث يجرى الفصل عند درجة حرارة تقع ما بين ٦٠-٨٠°م وأعمدة الـ HPLC غالية الثمن ولذلك يجب العناية بها لمنع تلف أدائها.

يوضع قرص Disc مسامى عند بداية العمود لمنع مرور أى مادة صلبة داخل العمود. ويلاحظ أن عدد n لهذه الأعمدة يتراوح بين ٥٠٠٠٠ إلى ٢٥٠٠٠٠.

الكواشـــف Detectors

بعد مرور الطور السائل داخل العمود يمر خلال الكاشف حيث يعطى خط Base Line ثابت ويجب أن يستجيب لمكونات العينة حيث يعطى إشارات كهربائية تظهر على هيئة كروماتوجرام ويجب أن تكون الإستجابة الكهربائية للكاشف تتناسب خطيا مع تركيز كل مكون فى العينة المراد تحليلها وهذا يؤدى الى تقدير مكونات العينة كميا. (انظر صفحة ٧٧).

وعادة تكون إستجابة معظم الكواشف خطية حتى حد معين وعلى ذلك وجب التأكد من أن الكاشف يعمل حتى مدى التركيز الخطى.

والكواشف المستخدمة فى حالة HPLC تقع تحت قسمين رئيسين:

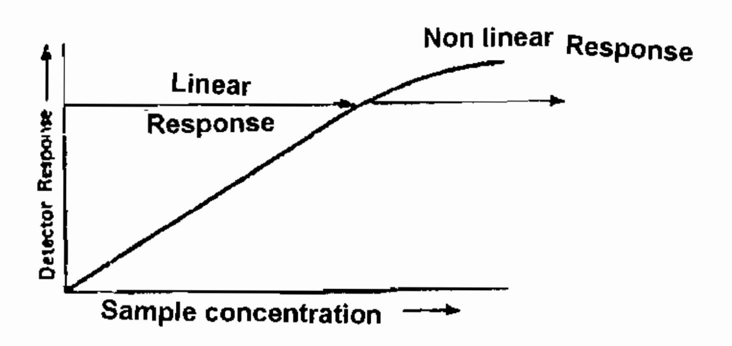
١- كواشف تقدر بعض خصائص الطور المتحرك مثل التوصيل أو معامل الإنكسار والكواشف من هذا النوع ذات حساسية منخفضة ولكنها تكشف عن أغلب إن لم يكن كل مكونات العينة.

٢ - كواشف تقدر بعض خصائص معينة لمكونات العينة مثل الإمتصاص عند أطوال موجية معينة والكواشف من هذا النوع لها حساسية عالية وليس من الضرورى أن تستجيب لكل مكونات العينة.

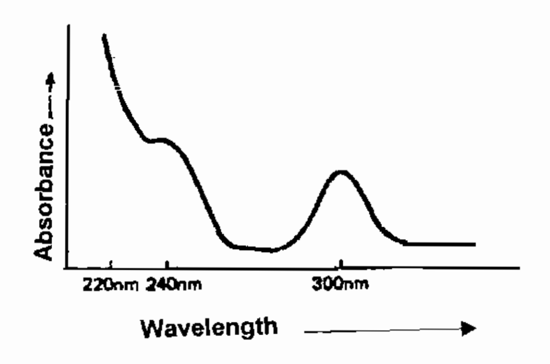
أولا: كاشف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية:

.Ultraviolet absorbance detector

يعتبر هذا الكاشف أكثر أنواع الكواشف انتشارا فى التحليل الكروماتوجرافى السائل ولا تحدث تكسير لمكونات العينة ويكشف عن تركيزات قليلة جدا تصل الى $١٠^{-٩}$ جم من العينة (نانوجرام) وطريقة عمله تعتمد على أساس أن العديد من المركبات العضوية تمتص إشعاعات فى منطقة UV والشكل فى صفحة (٧٧)



العلاقة بين استجابة الكاشف وتركيز العينة



العلاقة بين الإمتصاص عند أطوال موجية مختلفة وتركيز مكون العينة

يبين منحنى الإمتصاص الطيفى ويلاحظ أن أقصى إمتصاص يحدث عند طول موجة واحدة.

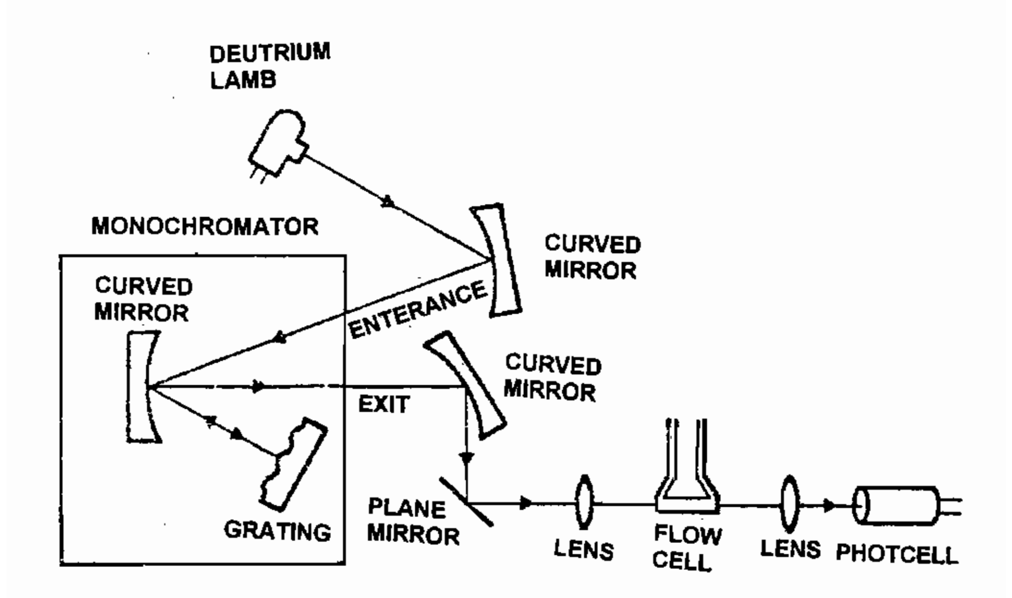
ويحدث نتيجة لإمتصاص أشعة UV تغير فى الطاقة الداخلية للجزىء وبالتالى تغير فى تركيبة الإلكترونى فالمركبات التى تحتوى على روابط مشبعة تمتص كمية قليلة من أشعة UV بالمقارنة بالمركبات غير المشبعة.

وفى الحقيقة أن الإمتصاص لوجود رابطة زوجية واحدة يكون نسبيا ضعيفا وتظهر أقصى إمتصاص عند طول موجة من ١٩٠– ٢٠٠ وفى حالة الروابط غير المشبعة المتبادلة Conjugated لمركب فإنه يمتص مقدار كبير وأن أقصى إمتصاص يتحرك نحو طول الموجة الأطول.

تسمى المجموعة الفعالة فى الجزىء والتى تسبب امتصاص فى UV مجموعة كروموفورية وتوجد مجاميع لا تمتص فى منطقة UV فى الجزىء ولكن تؤثر فى الـ Spectrum عن طريق انتقال أقصى امتصاص أو زيادة أو خفض قيمة الإمتصاص وبصفة عامة فإن المجاميع غير القطبية مثل الميثايل لها تأثير قليل فى حين أن المجاميع القطبية مثل الأمين أو النيترو تستطيع أن تغير جوهريا فى Spectrum الخاص بالمركب. والامتصاص فى منطقة الـ UV يحكمه قانون Beer- Lambert، الذى يربط ما بين نسبة الضوء الساقط الى الضوء الناقد مع تركيز المركبات فى محلول العينة وطول الخلية التى بها العينة وعند أى طول موجى فإن:

$$\text{Log } I_0 / I = KCL............. (1)$$

ويعرف الإصطلاح $\text{Log } I_0 / I$ باسم Absorbance والثابت K يسمى معامل الإمتصاص Extension Coefficient، ومن المعادلة (١) يتضح أنه



رسم تخطيطى يبين مكونات كاشف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية

عندما يمر شعاع فى منطقة الـ UV خلال محلول العينة فى خلية Cell ذات أبعاد ثابتة فإن الإمتصاص يتناسب خطيا مع تركيز العينة.

ومصدر إشعاعات UV فى حالة الكاشف UV لجهاز HPLC هو لمبة زئبق أو لمبة الديتريم ولمبة الزئبق تبعث دائما إشعاع ذو طول موجي واحد وهو ٢٥٤ نانومتر والكواشف التى تعمل بمصدر الإشعاع هذا تعمل فقط عند هذا الطول الموجى وللقياس عند أطوال موجية أخرى فإنه لابد من تغيير اللمبة ثم يخرج إشعاعات ذات أطوال موجية فى المدى من ١٩٠- ٣٨٠ وبإستخدامها مع موحد الموجات Monochromator فإنه يمكن إجراء التقدير الكمى على المدى ١٩٠- ٣٨٠.

والكواشف التى تعمل على أطوال موجية مختلفة تتميز عن الكواشف التى تعمل عند طول موجة واحدة بالآتى:-

١- يمكن ضبط طول الموجة التى تحدث عندها أقصى امتصاص للمادة المراد تقديرها للوصول الى أقصى حساسية.

٢- فى بعض التحليلات يكون لها الصفة الإختيارية Sensitivity فمثلا فى حالة التحليلات الدقيقة جدا Trace analysis فإنه يمكن التحكم فى اختيار طول الموجة التى عندها فقط تمتص المركبات الموجودة على هيئة آثار وبالتالى تمنع مشاكل التداخل من وجود مكونات ذات تركيز عالى بالعينة.

ثانيا: كاشف معامل الإنكسار Refractive index (RI)

يعتمد عمل هذا الكاشف على تقدير معامل الإنكسار للطور المتحرك حاملا المركبات المفصولة. يجب أن تكون درجة حرارة خلية العينة Sample cell

وخلية البلانك Blank Cell ثابتة وإن الإختلاف فى درجة الحرارة يكون فى حدود ٠,٠٠١م. وحساسية هذه الكواشف أقل من حساسية كواشف UV فهى تكشف فى حدود ١٠$^{-٦}$ جم من العينة (ميكروجرام). تستخدم هذه الكواشف فى حالة المركبات التى ليس لها خواص الإمتصاص.

ثالثا: الكواشف الفلورية: Fluorimetric

يعرض محلول المركبات المفصولة من العمود إلى أشعة فوق البنفسجية من هذه الكواشف عند طول موجة معينة Excitation wavelength (أشعة تؤدى الى تهيج مكونات العينة) وتخرج الطاقة الفلورية من محلول العينة عند طول موجى أطول Emission wavelength (طاقة انبعاث) وهى التى يجرى قياسها.تستخدم هذه الكواشف فى تقدير المركبات التى لها خاصية الفلورة أو مع المركبات التى تتحول الى مشتقات فلورية. تمتاز هذه الكواشف بأن لها حساسية أعلى من كواشف الأشعة فوق البنفسجية ولذلك تستخدم فى تقدير المركبات التى توجد على هيئة آثار.

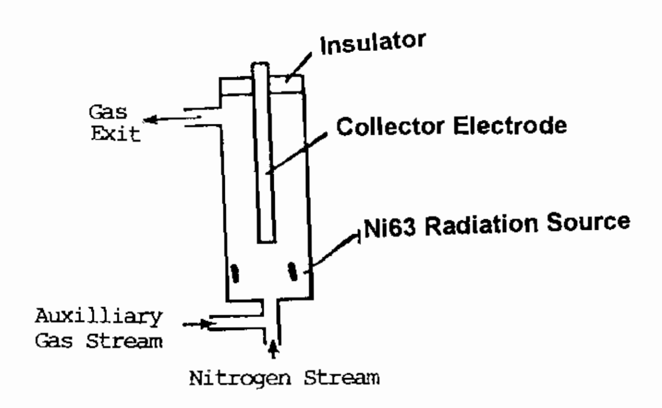
رابعا: Electron Capture detector (ECD)

يمتاز هذا الكاشف بحساسية عالية وله الصفة الإختيارية ويتكون من مصدر إشعاع Ni^{63} وزوج من الإلكترودات يمر خلالهما فولت قطبى Polarizing Voltage. يمر غاز خامل مثل النيتروجين خلال الكاشف الذى يحدث له تأين بواسطة الإشعاع Radiation. ونتيجة لهذا التأين يمر تيار ما بين الالكترودين الذى يكبر ويسجل. والشكل فى صفحة (٨٢) يبين تركيب الكاشف ECD.

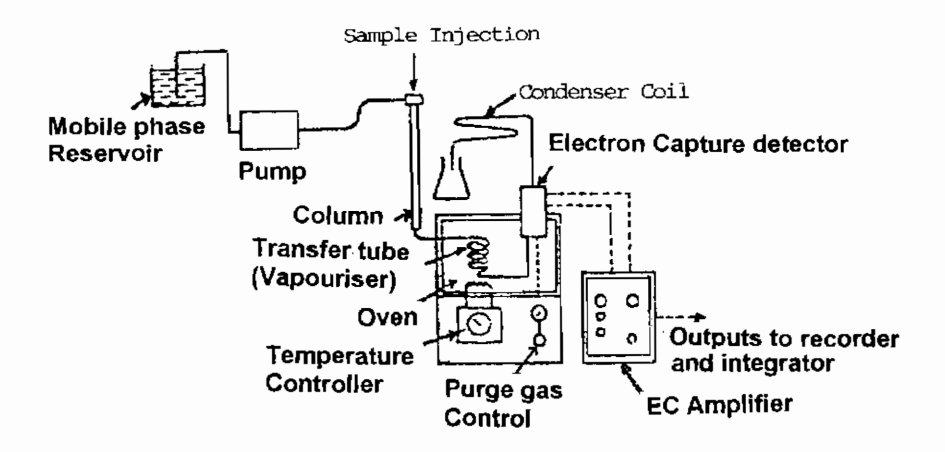
تظهر بعض المركبات تآلف للإلكترونات فإذا دخلت مادة من هذا النوع خلال ECD فتكون النتيجة هى خفض عدد الإلكترونات فى الحجرة وبالتالى يقل

$$N_2 + \beta \longrightarrow N^{+}_2 + e^-$$

تأين غاز النيتروجين بأشعة بيتا



أجزاء كاشف ECD



رسم تخطيطي يبين مكونات جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل مزود بكاشف ECD

التيار المار ما بين الإلكترودين ومن ناحية أخرى نجد أن المركبات التى ليس لها تآلف للإلكترونات عند مرورها خلال الكاشف تحدث تأثير قليل أو ليس لها تأثير على Standing current وعلى ذلك فإن ECD له الصفة الإختيارية ويستجيب فقط للمركبات التى ترتبط بالإلكترونات مثل الهالوجينات ومركبات النيترو وبعض المواد الأخرى ذات الأنوية العطرية المتعددة.

يمر Column elutent خلال أنبوبة من الحديد الغير القابل للصدأ حيث يسخن الى درجة حرارة كافية لتطاير المذيب ومكونات العينة. ثم تمرر الأبخرة الى ECD عن طريق تيار من النيتروجين. وهناك أنبوبة متصلة بالـ ECD من الحديد الغير قابل للصدأ تعمل كمكثف حيث يجمع الطور المتحرك السائل.

وأن أفضل مذيب كطور متحرك فى نظام EC/ LC هو الذى يظهر أقل تآلف ممكن بالنسبة للإلكترونات مثل الهكسان أو الأيزوأوكتان ولكن يفضل كروماتوجرافيا استخدام طور متحرك أكثر قطبية. ويمكن استخدام طور متحرك يتكون من هكسان أو أيزوبروبانول مضافا اليه مذيبات مثل الميثانول- أيزوبروبانول- الخ.. وهذا يؤدى الى رفع قطبية الطور المتحرك وتسمى المذيبات التى ترفع من قطبية الطور المتحرك باسم Modifiers وتعتمد الكمية التى تضاف من هذه المذيبات على نوع الـ Modifier ومعدل السريان، فيما يلى أنواع الـ Modifier المعتاد إضافتها لرفع قطبية الطور المتحرك وهى: ٣٪ ميثانول- ٧,٥٪ ايزوبروبانول- ١٥٪ تتراهيدروفيوران- ١٠٪ Dioxin- ١٥٪ بنزين.

ويجب عدم استخدام مذيبات تحتوى على أكسجين حيث تعمل على الإرتباط مع الإلكترونات ولذلك يجب إمرار غاز النيتروجين خلال الطور المتحرك للتخلص من الأكسجين. أيضا يجب تخلص المذيبات من الشوائب التى ترتبط مع الإلكترونات.

٦-٣-الطـــور المتحـــرك: Mobile phase

يقوم الكروماتوجرافى السائل بتحليل العينات التى تختلف فى درجة ذوبانها ويتم فصل مكونات العينة نظرا لوجود تداخل Interaction ما بين مكونات العينة والمادة المعبأة والطور المتحرك- ويجب أن تذوب العينة فى الطور المتحرك كما يجب أن يلائم الطور المتحـــرك نظام الكشف Detection system فإذا كان الكاشف من نوع UV مثلا فإنه يجب على الطور المتحرك ألا يظهر أى امتصاص على طول الموجة التى يجرى عليها التقدير.

القطبيـــة: Polarity

يستخدم لفظ القطبية بكثرة فى التحليل الكروماتوجرافى لوصف خصائص المواد المعبأة داخل العمود -الأطوار المتحركة- والمواد عديمة القطبية هى التى لا تحتوى فى تركيبها الجزئى على مجاميع فعالة تكون روابط ايدروجينية مثل الهيدروكربونات المشبعة (هكسان مثلا) والمواد القطبية هى التى تحتوى على مجاميع فعالة مثل هيدروكسيل- أمين- كربوكسيل.... الخ.

وتقسم المذيبات المستخدمة فى جهاز HPLC كطور متحرك تبعا لقطبيتها ويختلف الى حد ما سلوك المذيب تبعا لنوع المواد المعبأة داخل العمود والشكل فى صفحة (٨٥) يبين عدة مذيبات مرتبة تبعا لقطبيتها باستخدام عمود معبأ بمادة السليكاجيل. ويمكن تحضير طور متحرك ذو قطبية معينة عن طريق خلط مذيبين أو أكثر يختلفان فى القطبية.

والجدير بالذكر أن الفصل الجيد فى حالة GLC يعتمد على اختيار العمود حيث توجد أعمدة معبأة بأطوار ثابتة عديدة وفى حالة HPLC فإن الفصل الجيد يعتمد على نوع وظروف الطور المتحرك وعلى ذلك:

تعتمد كفاءة الفصل على إتباع النقاط التالية:

١ – نوع الطور المتحرك سواء كان عضوى أو مائى.

٢ – تركيب الطور المتحرك سواء أكان مذيب واحد أو أكثر من مذيب.

٣ – درجة حموضة pH الطور المتحرك.

٤ – المواد التى تضاف الى الطور المتحرك مثل الأمينات – الأحماض – محاليل منظمة – منظفات.

Increasing polarity ↓

n-Pentane
n-Hexane
Iso-octane
cyclohexane
Diethyl ether
Chloroform
Dichloromethane
Tetrahydrofuran
Dioxan
Acetonitrile
Iso-propanol
Ethanol
Methanol
Water

* المذيبات شائعة الاستخدام فى جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل مرتبة تبعا لقطبيتها

ويشترط فى الطور المتحرك ما يلى:-

١ – نقى

٢ – رخيص الثمن وسهل الحصول عليه

٣ – تذوب فيه مكونات العينة

٤- لا يغير فى طبيعة العمود.

٥- يلائم الكاشف.

٦- له لزوجة منخفضة.

٧- يمكن استرجاعه من العينة بسهولة وإعادة إستخدامه مرة أخرى إذا أمكن ذلك.

يجب قبل استخدام الطور المتحرك إتباع ما يلى:

١- يرشح قبل دخوله المضخة لمنع انسداد الصمامات Valves.

٢- يجرى إزالة الهواء من الطور المتحرك لأن الهواء يؤدى عند دخوله الى الكاشف الى تكوين noise بجانب الإشارات Signals.

تخلص الطور المتحرك من الهواء Solvent degassing

يذوب الهواء فى كل المذيبات المستخدمة كطور متحرك فى HPLC ومع ذلك فإن درجة ذوبان الهواء تختلف اختلافا كبيرا فالمذيبات القطبية وبصفة خاصة الماء لها درجة ذوبان عالية بينما المذيبات الغير القطبية مثل الهكسان لها درجة ذوبان منخفضة. ويؤدى الهواء المذاب فى المذيب الى تقليل كفاءة صمامات المضخة وأيضا عند استخدام كاشف UV تتكون فقاعات فى الخلية Flow cell مما يؤدى الى عدم ثبات Base line ولهذا يجب التخلص من الهواء فى المذيب قبل إستخدامه.

وهذا يتم بعدة طرق منها:-

١- غليان المذيب تحت مكثف عاكس يتبعه التبريد قبل الإستعمال.

٢- استخدام تفريغ.

٣- امرار غاز الهيليوم خلال المذيب حيث يحل الهيليوم محل الهواء الذى له درجة ذوبان منخفضة جدا.

٤- استخدام جهاز Ultrasonic لطرد الهواء.

توجد ثلاث طرق لإمرار الطور المتحرك خلال الطور الثابت وهى:

١- استخلاص متدرج Gradient elution.

٢- تدرج حرارى Temperature programming.

٣- تدرج فى معدل السريان Flow programming.

والتكنيك الأول هو الأكثر كفاءة حيث يعطى فصل واضح بالمقارنة بالطريقتين الأخيرتين.

يختلف الإستخلاص المتدرج عن الاستخلاص الثابت Isocratic elution (استخلاص بطور متحرك ذو تركيب ثابت) فى أنه:

١- يقلل من حدوث Tailing للـ Peak.

٣- يقلل من مقدار عرض قاعدة الـ Peaks أى تزيد من حساسية وكفاءة الفصل.

التـــوزيع Distribution

عند إضافة مادة ما الى نظام مكون من سائلين لا يمتزجان فإنه تختلف قابلية هذه المادة للذوبان فى كلا السائلين وأن تركيز المادة فى الطورين تكون ثابتة عند درجة حرارة معينة وتعرف نسبة التوزيع بمعامل التوزيع Partition coefficient وفى حالة التوزيع الكروماتوجرافى يتم فصل مكونات العينة عن طريق استخدام التوزيع المنافس للعينة ما بين الطورين السائلين إحداهما الطور

الثابت داخل العمود والآخر الطور المتحرك. ويعتمد هذا التوزيع على الذوبان النسبى Relative solubility للمكونات فى كل الطورين. ونظرا لإختلاف الذوبان النسبى لمكونات المخلوط فإنها تمضى Spent أوقات مختلفة فى الطور الثابت وفى النهاية يخرج من العمود كل مكون على حده وعلى مدى التداخلات مع الطور الثابت فإنها تتحكم فى درجات الإرتباط (المركبات ذات الإرتباط المنخفض تخرج Elute من العمود قبل المكونات الأكثر ارتباطا). وتبعا لطبيعة خاصية التوزيع فإنه يوجد نوعان وهما الفصل العادى Normal phase والفصل المعاكس Reverse phase وفى حالة الفصل العادى يستخدم طور ثابت قطبى لفصل مكونات العينة القطبية وطور متحرك غير قطبى أما طريقة الفصل المعاكس فإنه يستخدم طور ثابت غير قطبى وطور متحرك قطبى لفصل المركبات غير القطبية.

Reverse phase chromatogram	Normal phase chromatogram
طور ثابت: غير قطبى	طور ثابت: قطبى
طور متحرك: قطبى	طور متحرك: غير قطبى
قطبية المخلوط: غير قطبى	قطبية المخلوط: قطبى

٦-٤- الأطوار الثابتة المرتبطة كيماويا

Chemical bounded stationary phases

يلاحظ فى الأعمدة المستخدمة فى أجهزة HPLC أن الطور الثابت يغطى مادة دعامية مثل السليكا ويرتبط فقط بقوى طبيعية Physical forces ويجب أن يظل تركيز الطور الثابت داخل العمود ثابتاً ولهذا فإنه من الضرورى استخدام طور متحرك لا يذيب الطور الثابت وأنه من الصعوبة عمليا وجود نظام يشتمل على طور ثابت/ طور متحرك لا يفقد من العمود باستمرار كميات من الطور الثابت نظرا لذوبانه فى الطور المتحرك وللتغلب على هذه المشكلة فإنه من

الممكن تشبيع الطور المتحرك بواسطة الطور الثابت قبل مروره داخل العمود وحيث أن الذوبان يعتمد على درجة الحرارة فإنه يجب أن يظل المتشبع Satura-tor والعمود عند نفس درجة الحرارة.

وهناك حل أفضل لهذه المشكلة وهو أن يرتبط الطور الثابت كيماويا على سطح المادة الدعامية وهذا يجعله غير ذائب فى الطور المتحرك وهناك العديد من التفاعلات المختلفة التى تستخدم لربط الجزىء العضوى الى سطح السيليكا كما فى المعادلات التالية (انظر صفحة ٨٩). الرابطة Si-O-R يمكن تحليلها مائيا وعلى ذلك يمكن استخدام مذيبات مائية كطور متحرك فى هذا النوع من الأعمدة والرابطة $Si- R$ & $Si- O- Si- R_3$ شديدة الثبات ويمكن إستخدام هذه الأطوار الثابتة مع جميع المذيبات الشائعة فى أجهزة HPLC ونتيجة إختلاف التركيب الكيماوى للأكليل (R) فإنه يمكن الحصول على أطوار ثابتة مرتبطة كيماويا ذات مدى واسع من القطبية. والجدول فى صفحة (٩٠) يبين الرموز الكيميائية لأهم الأطوار الثابتة المرتبطة كيماويا على سطح مادة السيليكاجيل.

1. $\equiv Si - OH \quad + \quad ROH \longrightarrow \equiv Si - O - R$

Silica surface

2. $\equiv Si - OH \quad + \quad R_3SiCl \longrightarrow \equiv Si - O - SiR_3$

3. (a)

$\equiv Si - OH \quad + \quad SoCl \longrightarrow \equiv Si - Cl$

4. (b)

$\equiv Si - Cl \quad + \quad RLi \longrightarrow \equiv Si - R$

تكوين الأطوار الثابتة المرتبطة كيماويا على مادة السليكا

المواد المعبأه شائعة الاستعمال المحتويه على روابط كيماوية

stationary phase	Type	PELLICULAR	MICROPOROUS
octadecyl (c_{18})	non polar (aliphatic)	CO:PELL ODS PERMAPHASE ODS BONDAPAK C_{18}-CORASIL PERISORB RP	PATISIL 10 ODS ODS-HYPERSIL LICHROSORB C_{18}
phenyl	non polar (aromatic)	BONDAPAK PHENYL/CORASIL	
alkyl nitrate (cyano)	medium polarity	CO:PELLPAC	PARTISIL 10 PAC LICHROSORB-CN
ether	medium polarity	PERMAPHASE ETH	
alkyl amine ($-NH_2$)	medium polarity		LICHROSORB-NH_2
diol	high polarity		μ -BONDAPAK NH_2 LICHROSORB DIOL

يوجد نوعان من الأطوار الثابتة وهما:

النـــــــوع الأول:

يعبأ العمود بمادة ذات محيط دائرى قطره حوالى ٤٠ ميكرون وسمك الطور الثابت حوالى ١-٢ ميكرومتر ويسمى Pellicular وهو سهل التعبئة وذو كفاءة فصل جيد.

النــــوع الثانـــى:

تستخدم جزيئات صغيرة جدا من مادة السيليكا مسامية (5-10 um) وهذه الجزيئات Micro particulate phase chromatography صعبة فى تعبئتها بالمقارنة بالنوع الأول ولكنها تعطى فصل أفضل بكثير.

وعموما توجد ثلاثة أنواع من الأطوار الثابتة وهى:

١- جزيئات شديدة الصلابة Solid particles

٢- جزيئات مسامية بدرجة بسيطة Pellicular resin

٣- جزيئات مسامية بدرجة عالية Porous resin

يتكون النوع الأول من مادة شديدة الصلابة Rigid وذات تركيب خارجى غير منفذ ونتيجة لسطحه الصلب فإنه يكتسب خاصية الفصل السريع ونظرا لصغر مساحة سطحه الخارجى فإنه تستخدم حجوم صغيرة من العينة وتقل كفاءة الفصل بزيادة حجم المخلوط المراد فصل مكوناته وعندما تكون مساحة السطح الخارجى للطور الثابت كبيرة كما فى حالة النوع الثانى فإنها تزيد من كفاءة الفصل وأيضا يزداد حجم المخلوط المحقون. وفى النوع الثالث ذو المسامية العالية فإنها تعطى فصل عالى جدا ولكن قد تزيد من وقت التحليل. ويوجد عامل آخر

هام يؤثر على الفصل وهو حجم الجزيئات. فالجزيئات ذات القطر الصغير تؤدى الى تحسين كفاءة الفصل وعلى ذلك يجب استخدام الجزيئات الصغيرة كلما أمكن ذلك. ووجد أن القطر المثالى وهو ٣ ميكرون كما أن قطر الجزيئات حتى ١٠ ميكرون تعطى فصل جيد وعند زيادة القطر عن ذلك تنخفض كفاءة الفصل- وهناك نقطة أخرى هامة وهى يجب أن تكون أقطار الجزيئات متجانسة وأن أى اختلاف فى القطر يؤدى إلى سلوك مكونات المخلوط مسارات متعددة وهذا يقلل من كفاءة الفصل.

والجدول التالى (صفحة ٩٣) يبين بعض المواد المعبأة المحتوية على روابط كيمياوية وشائعة الإستعمال.

اختيار المادة المعبأة والطور المتحرك:-

عند اختيار المادة المعبأة والطور المتحرك لفصل مكونات العينة بواسطة جهاز HPLC يجب الأخذ فى الاعتبار بالنقاط التالية:

١- التركيب الكيماوى لمكونات العينة أو بمعنى آخر نوعية المجاميع الفعالة (حامضية، قاعدية، ألدهيدية... الخ).

٢- ذوبان مكونات العينة هل تذوب فى مذيب عضوى، تذوب فى ماء، تذوب فى قلوى، تذوب فى حمض.

٣- توافق استجابة مكونات العينة مع الكاشف.

٦-٥- التقدير الكمي Quantitative analysis

تختلف إستجابة الكاشف فى HPLC من مركب الى آخر فمثلا إستجابة UV تعتمد على معامل الإمتصاص لمكونات العينة وإستجابة الكاشف ECD يعتمد على تآلف إلكترونات العينة وأن أفضل طريقة للتقدير الكمى هى عمل -Calibra

POROUS RESIN

Pellicles

Micro particulate
Porous silica particles

40µm

1.2 µm surface
Adsorbent layer
e. g. SiO_2 , Al_2O_3

6µm

10µm

INERT CORE

INERT CORE

SOLID PARTICLE

PELLICULAR RESIN

POROUS RESIN

* الاطوار الثابتة

* التركيب الكيماوى لبعض أنواع الأطوار الثابتة المرتبطة كيماويا على سطح مادة السيليكا

MODE	FUNCTIONALITY	STRUCTURE OF BONDED GROUP
NORMAL PHASE	AMINO	$-NH_2$
	CYANO (NITRILE)	$-CN$
	DIOl	$-Si-O-CH_2-CH(OH)-CH_2OH$ / O / $-Si-O-CH_2-CH(OH)-CH_2OH$ / O / $-Si-O-CH_2-CH(OH)-CH_2OH$
REVERSED PHASE	DIMETHYLSILYL	$=Si(CH_3)_2$
	OCTYLSILYL	$\equiv Si-CH_2-(CH_2)_6-CH_3$
	OCTADECYLSILYL	$\equiv Si-CH_2-(CH_2)_{16}-CH_3$
	PHENYSILYL	$\geq Si-C_6H_4-OH$

tion لإستجابة الكاشف بإستخدام مركب قياسى Reference يضاف إلى محلول العينة أى طريقة Internal standardization وهى تشمل الخطوات التالية:-

١- يجرى تحليل للعينة للحصول على كروماتوجرام لمعرفة عدد ونوع مكوناتها. تختار مادة لا توجد ضمن مكونات العينة ولها وقت ظهور يقع ما بين Two peaks للعينة على الكروماتوجرام.

٢- تقدر استجابة الكاشف لكل مكون من مكونات العينة منسوبا الى المادة الداخلية وذلك بإجراء التحليل للعينة المحتوى على المادة القياسية ويجب معرفة تركيز كل مكون من مكونات العينة بالضبط ويلاحظ أن:

مساحة الـ Peak لأى مكون تتناسب طرديا مع تركيزه فى العينة.

.. مساحة الـ Peak = K x تركيزه فى العينة

حيث أن K هو معامل إستجابة الكاشف لمركب معين

وبالنسبة الى المكون A (انظر صفحة ٩٦) فإن:

Peak area (A) = K_A x Concentration (A)...... (١)

وبالنسبة للمادة القياسية الداخلية (IS) فإن

Peak area (IS) = K_{IS} x Concentration (IS)..... (٢)

بقسمة المعادلة (١) على المعادلة (٢) نستنتج ما يلى:

Peak area (A) / Peak area (IS) =(K_A/K_{IS}) x Concentration (A)/Concentration (IS) (٣)

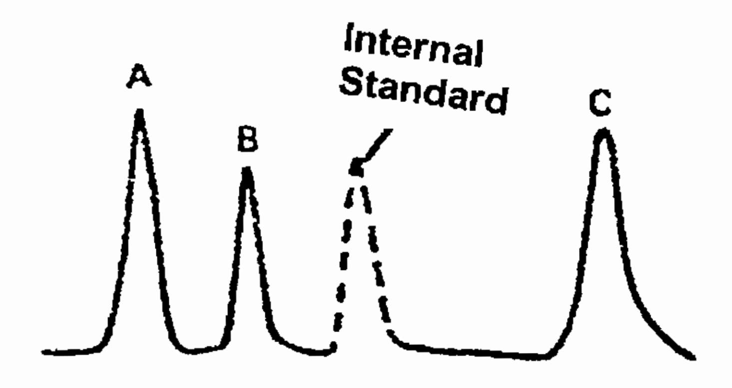
تعرف النسبة K_A / K_{IS} بمعامل استجابة الكاشف للمركب A منسوبا الى المادة القياسية أو K_1 بالنسبة للمكون الأول وتجرى نفس العملية بالنسبة لباقى مكونات العينة لإستنتاج قيم معاملات الإستجابة لها (k_2, k_3, K_4,... etc).

وعمليا تضاف كمية معروفة بالضبط من المادة القياسية الى العينة المراد تحليلها ثم يجرى التحليل بواسطة جهاز الكروماتوجرافى ومن المعادلة (٣) نستنتج المعادلة (٤).

Concen. (A) = Peak area (A) / Peak area (IS). Concen. (IS)/ K_I (٤)

بوضع قيم مساحات الـ Peaks من الكروماتوجرام ومعاملات الإستجابة النسبية من التحليل Calibration analysis وتركيز المادة القياسية المضاف فى المعادلة (٤) فإنه يمكن حساب تركيز كل مكونات العينة.

وحيث أن هذه الطريقة تعتمد على نسبة مساحات الـ Peaks وليس على وزنة العينة فإن دقة القياس فى هذه الطريقة لا تعتمد على الكمية المحقونة بالضبط ولكن تعتمد على دقة حساب مساحات الـ Peaks.



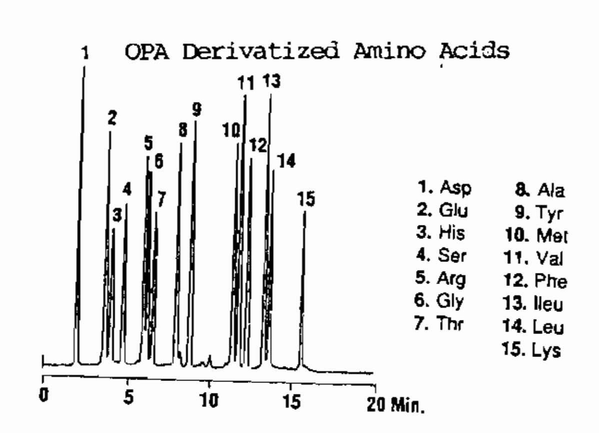
* كروماتوجرام يبين فصل مكونات عينة ما بالإضافة إلى مادة قياسية داخلية

٦-٦- ظروف الفصل المختلفة لبعض مشتقات الأحماض الامينية:

١- مشتقات OPA للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Altima C18
أبعاد العمود	٢٥٠ X ٤ سم
تركيب الطور المتحرك	A: 50 mM Na Ac buffer, pH 5.7, 5% THF THF = Tetra Hydro furan
برنامج الاستخلاص التدريجى	الزمن (دقيقة): صفر ١٥ ٥ B٪: ١٠ ٦٥ ١٠
معدل سريان الطور المتحرك	٢ مل/ دقيقة
الكاشف	Fluorescence

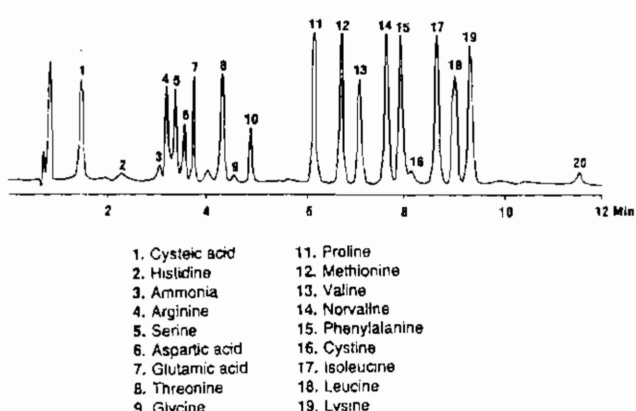
الكروماتوجرام التالى يبين تتابع ظهور مشتقات OPA للأحماض الأمينية.



٢ - مشتقات الـDansyl للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Aquapore RP- 300 C8
أبعاد العمود	٢٢٠ X ٤,٦ مم
درجة حرارة العمود	٥٥ م
تركيب الطور المتحرك	A: 0.05 M Formic acid, 0.06 M Acetic Acid, to pH 2.6 with Na OH B: A with 35% V/V isopropanol
برنامج الاستخلاص التدريجى	الزمن (دقيقة): صفر ٣٠ ١,٥ ٨,٥ B%: صفر ٣٥ ١٠ ٨٥
معدل سريان الطور المتحرك	٤ مل/ دقيقة
الكاشف	UV عند طول موجه ٢٥٤

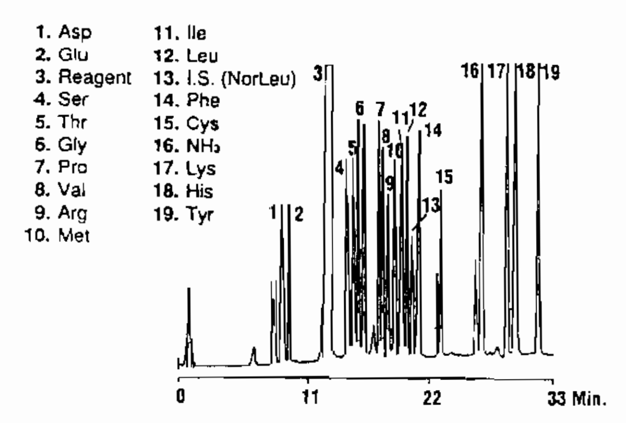
والكروماتوجرام التالى يبين تتابع ظهور مشتقات Dansyl للأحماض الأمينية.



٣- مشتقات DABS للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Spheri-RP-18
أبعاد العمود	٢٢٠ x ٤,٦ مم
تركيب الطور المتحرك	A: Na O Ac with 5% DMF, pH 6.5 B: Acetonitrile DMF: Dimethyl Formamide
برنامج الاستخلاص التدريجى	الزمن (دقيقة): صفر ٣٠ ٤٢ ٤٤ ٤٦ B%: ١٠ ٣٥ ٥٥ ٥٥ ٨٥
معدل سريان الطور المتحرك	١ مل/ دقيقة
الكاشف	UV/VIS عند طول موجه ٤٣٦

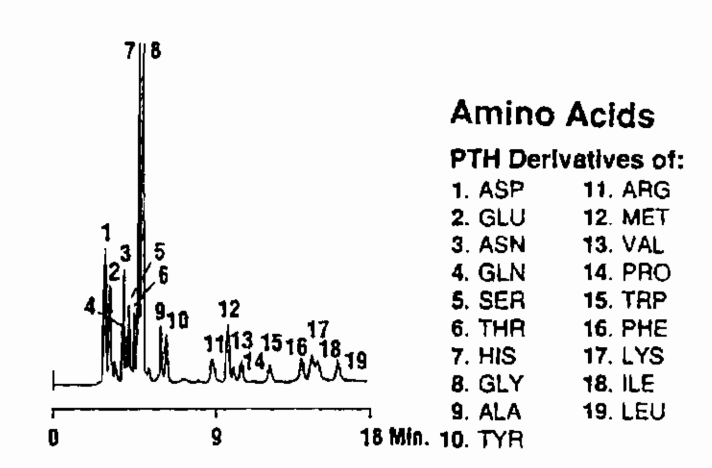
والكروماتوجرام التالى يبين تتابع ظهور مشتقات DABS للأحماض الأمينية.



٤ - مشتقات الـ PTH للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Ultrasphere C18
أبعاد العمود	٢٥٠ X ٤,٦ مم
درجة حرارة العمود	٥٥ م
تركيب الطور المتحرك	A: 0.1 M Na OAc: Acetonitrile, pH4.9
معدل سريان الطور المتحرك	١ مل/ دقيقة
الكاشف	UV عند طول موجه ٢٥٤

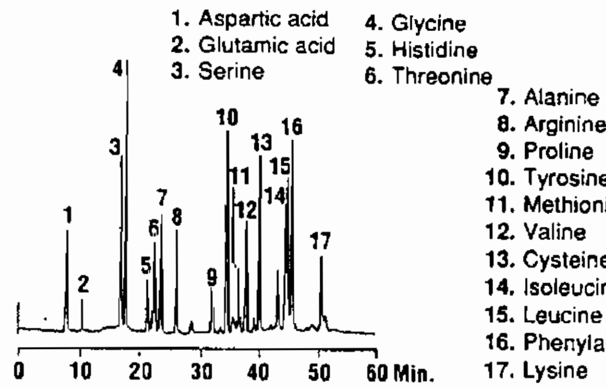
والكروماتوجرام التالى يبين تتابع ظهور مشتقات الـ PTH للأحماض الأمينية.



٥- مشتقات الـ PTH للأحماض الأمينية:-

نوع العمود	Econosphere- C8
أبعاد العمود	٢٥٠ X ٤,٦ مم
تركيب الطور المتحرك	A: 50 mM ammonium acetate, pH 4.6 B: 100 m M ammonium acetate, pH 6.8 Methanol (20: 80)
برنامج الاستخلاص التدريجى	الزمن (دقيقة) : صفر ٣٠ ١٢ ٣٠ B% : صفر ٣٥ ٢٠ ٣٠
معدل سريان الطور المتحرك	١ مل / دقيقة
الكاشف	UV عند طول موجه ٢٥٤

والكروماتوجرام التالى يبين تتابع ظهور مشتقات الـ PTC للأحماض الأمينية.



مميـــزات طـــرق HPLC

وقت الفصل يكون قصيراً، أكثر حساسية، ولا يحتاج الفصل الى درجة حرارة عالية No elevated temperature، ومع ذلك فإن طرق الـ HPLC لها عيوب.

عيـــوب طـــــرق HPLC

تعتمد غالبية طرق فصل مشتقات الأحماض الأمينية على جزيئات السيليكاجيل الكروية Spherical silica gel المغطاة بطبقة من جزيئات عضوية ومرتبطة بروابط تساهمية. وهذه الطبقة تمثل الطور المعاكس Reversed phase وهى عبارة عن سلاسل هيدركربونية تحتوى على ١٨ ذرة كربون (C18 alkyl chain).

المشـــــكلة الأولــــى

تتمثل المشكلة الأولى فى محدودية Limited تماثل النتائج باستخدام أعمدة HPLC خاصة فى فصل الأحماض الأمينية. فمثلا تختلف كفاءة الفصل من عمود لآخر نظراً لاختلاف طريقة تحضير العمود بالمصنع. هذا يعنى أنه عند تغيير العمود لابد من الضرورى إجراء التجارب على العمود الجديد ليعطى الفصل المناسب. وتظهر هذه المشكلة بوضوح لانخفاض فترة صلاحية Life time استخدام أعمدة الطور المخالف. ويلاحظ أنه تنتهى صلاحية استخدام أعمدة الـ HPLC بعد حقن عدة مئات قليلة من العينات وبالتالى لابد من إهمالها Dis-carde أو إعادة تنشيطها Regenerate. ويلاحظ أنه عند تكوين مشتقات للأحماض الأمينية تصبح أكثر كرها للماء Hydrophobic عما كانت عليه، وهذا يؤدى إلى فصل بواسطة الطور الكروماتوجرافى المعاكس Reversed phase ولكن من ناحية أخرى فإن الخاصية الكارهة للماء تقلل بدرجة كبيرة الاختلافات

بين الأحماض الأمينية. بالإضافة إلى ذلك إذا احتاجت مشتقات الأحماض الأمينية إلى خطوة استخلاص فإن بعض الأحماض الأمينية يمكن فقدها جزئيا. وهذا يؤدى إلى تغيير فى تركيب محتوى الأحماض الأمينية وبالتالى الحصول على نتائج غير صحيحة.

المشـــكلة الثانيـــة

تتمثل فى المجاميع الفعالة الأخرى الموجودة فى السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية فتكون الاستجابة قليلة لأحماض السيستئين، الليسين والهيدروكسى ليسين. أيضا يمكن للحمض الأمينى الواحد أن يعطى أكثر من Peak بدلا من Peak واحد بسبب تكون مشتقات مختلفة.

المشـــكلة الثالثـــة

تتمثل فى العينة نفسها Matrix of the sample. فمن النادر ما توجد عينة تحتوى فقط على أحماض أمينية ماعدا المخلوط القياسى للأحماض الأمينية. وقد تتداخل مكونات العينة مع الجواهر المستخدمة لتقدير مشتقات الأحماض الأمينية، وبالتالى نحصل على نتائج غير دقيقة.

سابعا: آلية فصل الأحماض الأمينية باستخدام المبادلات الآيونية

ان استخدام المبادل الكاتيونى Cation exchanger (طور ثابت) مع تغيير فى درجة حموضة pH المحلول المنظم (طور متحرك) فإنه يمكن فصل مدى واسع من الأحماض الأمينية، وهذه هى الفكرة الأساسية التى يعتمد عليها جهاز تحليل الأحماض الأمينية.

وفيما يلى توضيح أكثر لكروماتوجرافيا التبادل الأيونى:-

كروماتوجرافي التبادل الآيوني Ion-exchange chromatography

يعتمد الأساس فى هذا النوع الكروماتوجرافى على الانجذاب Attraction ما بين الشحنات المتضادة فى الجزيئات، حيث تحتوى العديد من المواد الحيوية مثل الأحماض الأمينية والبروتينات على مجاميع قابلة للتأين Ionizable.

وفى الحقيقة أنها تحمل محصلة شحنات Net charge إما موجبة أو سالبة، وتستخدم فى فصل مخاليط هذه المركبات. وتعتمد محصلة الشحنات لهذه المركبات على درجة حموضة محلول الوسط pH وكذلك على نقطة التعادل الكهربى للمركب. ويوجد نوعان من المبادلات الآيونية:

مبادل كاتيوني Cation ومبادل انيوني Anion.

تحمل المبادلات الكاتيونية مجاميع محملة بشحنات سالبة، وبالتالى تتجذب الى الجزيئات المحملة بشحنة موجبة. ويطلق فى بعض الأحيان على هذه المبادلات اسم المواد المبادلة للأيونات الحمضية Acidic ion exchange mate-rials، حيث أن الشحنات السالبة لها تنتج من تأين المجموعات الحمضية. تنجذب المبادلات الآنيونية التى تحتوى على شحنات موجبة إلى الجزيئات المحملة بشحنة سالبة. ويستخدم اصطلاح المواد المبادلة للآيونات القاعدية Basic ion exchang materials حيث أن الشحنات الموجبة ناتجة من تأين المجموعات القاعدية.

نوع المبادل	المجاميع الفعالة	صفة التأين للمبادل	المبادل
مبادل أيونى حمضى	حامضية	سالب	كاتيونى
مبادل أيونى قاعدى	قاعدية	موجب	انيونى

توضع المبادلات الآيونية فى أعمدة لفصل مخاليط آيونية. وفى حالة وجود طور متحرك يحتوى على آيونات العينة الذى يمر خلال عمود يحتوى على مبادل آيونى فيحدث توزيع تنافسى للآيونات ما بين المبادل الآيونى والطور المتحرك ويعتمد معدل تحرك الأيونات خلال العمود على تآلفها النسبى Relative affinity، ويعتمد وقت الظهور R_t فى التحاليل التى تعتمد على المبادل الأيونى على عدة عوامل تشمل:-

١- حجم ونوع الشحنة فى آيونات العينة.

٢- درجة حموضة pH الطور المتحرك.

٣- التركيز الكلى ونوع الآيونات فى الطور المتحرك.

٤- وجود مذيبات عضوية مثل الميثانول فى الطور المتحرك.

٥- درجة حرارة العمود (درجة حرارة الأطوار الثابتة والمتحركة).

٦- معدل سريان الطور المتحرك.

والجدير بالذكر أن خاصيتى الأدمصاص والتوزيع تلعب دورا جزيئا Some Part فى الفصل باستخدام أعمدة المبادلات الآيونية. ولهذا فمن الصعب التنبؤ بسلوك أعمدة المتبادلات الآيونية فى بعض التحليلات، على العكس من الكروماتوجرافى السائل.

وتتم آلية التبادل الآيونى عن طريق خمس نقاط واضحة وهى:-

١- الانتشار الآيونى إلى سطح المتبادل. وتحدث هذه العملية بسرعة فى المحاليل المتجانسة.

٢- الانتشار الآيونى خلال تركيب جسم الـ Matrix المبادل إلى مواقع التبادل Exchange sit. وتعتمد هذه الخطوة على مدى الروابط العرضية

Cross linkage للمبادل وتركيز المحلول وهذه العملية هى أساس التحكم فى مدى عملية التبادل الآيونى الكاملة بذاتها.

٣- تبادل الآيونات عند موقع التبادل، تحدث هذه العملية فى الحال Instan-taneously ويتم خلالها الإتزان.

Cation exchanger:

$$\underset{\text{exchanger}}{RSO_3^-} \ldots \underset{\text{counter ion}}{Na^+} + \underset{\text{charged molecule to be exchanged}}{\overset{+}{N}H_3-R'} \rightleftharpoons RSO_3^- \ldots \overset{+}{N}H_3-R' + Na^+$$

Anion exchanger:

$$(R)_4\overset{+}{N} \ldots Cl^- + {}^-OOC-R' \rightleftharpoons (R)_4\overset{+}{N} \ldots {}^-OOC-R' + Cl^-$$

٤ - انتشار الأيون الذى تم مبادلته Exchanged خلال المتبادل إلى السطح.

٥ - الذوبان الاختيارى Selective desorption بواسطة المذيب ثم انتشاره الى المحلول الخارجى. وتعتمد عملية الذوبان الاختيارى للجزىء المرتبط على التغيرات فى درجة حموضة الوسط والتركيز الآيونى أو بواسطة تآلف الاستخلاص Affinity elution.

٧-١- تحضير مواد التبادل الآيوني

توجد عدة مواد مبادلة للأيونات Ion-Exchanger تجاريا تستخدم بنجاح فى فصل المواد الحيوية. وتحضر هذه المواد من الأستيرين مع ثنائى فينايل البنزين. ومركب عديد الأستيرين هو مركب عديد البلمرة، جزيئاته مرتبة فى خط مستقيم Linear polymer ويذوب فى العديد من المذيبات ويتكون نتيجة لتكثف الأستيرين مع ثنائى فينايل البنزين، جزيئات لها روابط عرضية هى التى تجعل الراتنج غير ذائب.

وتعتمد درجة تكوين الروابط العرضية Cross linkage على النسب المختلفة من ثنائى فينايل بنزين والأستيرين فاذا كانت نسبة المكون الأول أعلى من الأستيرين فانه يعطى مركب له روابط عرضية عالية.

والراتنجات ذات الروابط العرضية القليلة تسمح بنفاذ Permeable الجزيئات ذات الوزن الجزيىء الكبير عن الراتنجات ذات الروابط العرضية الكثيرة. وعند اجراء السلفنة Sulphonation للروابط العرضية لعديد الأستيرين فإنه يعطى راتنج مسلفن Sulphonated polystyrene مثل Dowex 50 الذى هو متبادل حمضى قوى حيث تتأين مجموعة السلفونيك ($-SO_3H$) على مدى واسع من درجة الحموضة pH ماعدا درجة الحموضة المنخفضة جداً. ويحضر المبادل القاعدى القوى عن طريق تفاعل الروابط العرضية مع كلوروميثايل إيثر ثم تفاعل مجاميع الكلورو مع أمينات ثلاثية. والمجموعات– $CH_2-N^+-(CH_3)_3$ Cl^- تتأين على درجات حموضة واسعة ماعدا درجة حموضة وسط عالية. وتمتاز جميع المواد المبادلة بأن لها سعة تبادلية كلية Total exchange capacity محددة، والتى تعرف بأنها عدد ملليمكافئات الآيونات القابلة للتبادل لكل جرام من المبادل أو لكل وحدة حجم من الراتنج الممتزج بالماء Hydrated resin وعلى ذلك فالسعة التبادلية للراتنج Bio- rad. AG-x4 تساوى ١,٢ ملليمكافىء لكل سم٣ وللمبادل DEAE- sephadex A2 له سعة تبادلية تساوى ٠,٥ ملليمكافىء لكل سم ٠,٣ وفى بعض الأحيان يستخدم اصطلاح السعة المتاحة Avaliable capacity للدلالة على السعة المتاحة لمركب معين مثل الهيموجلوبين، فالراتنج DEAE-sephadex A25 له سعة متاحة للهيموجلوبين تقدر بـ ٠,٠٧ جم/ سم٣ وتدل السعات التبادلية على درجة الاستبدال للراتنج، ومن ثم تعطى وسيلة ارشادية على مدى مجال الاستخدام. ومن ذلك يتضح أن الراتنجات تختلف فيما بينهما تبعا:

Styrene

Divinyl benzene

Co- polymerization of styrene and divinylbenzene.

١- حجم الجسيم Matrix

٢- درجة الروابط العرضية.

٣- درجة السلفنة.

يعبأ العمود بجزيئات صلبة من مادة سلفونات عديدة الأستيرين Sulphonate poly styrene سبق اتزانها Equilibrated مع محلول صودا كاوية. وفى هذه الحالة نجد أن مجموعات حمض السلفونيك تكون محملة كاملا بكاتيون الصوديوم (Na^+). وهذه الصورة من الراتنج تعرف باسم الصورة الصوديومية Sodium form. ويمكن تحضير الراتنج فى الصورة الهيدروجينية Hydrogen form عند غسيله بحمض. وتحدث عملية التبادل للأحماض الأمينية كما فى المعادلات التالية:

$$\text{Matrix-SO}^-_3\text{Na}^+ + \text{H}_3\text{N}^+\text{-CHR-COOH}$$
$$\uparrow\downarrow$$
$$\text{Matrix-SO}^-_3\text{H}_3\text{N}^+\text{-CHR-COOH} + \text{Na}^+$$

ومن ذلك يتضح أن فصل الأحماض الأمينية يعتمد بصفة عامة على:

١- إختلاف شحنات الأحماض الأمينية والذى يعتمد على قيم ثوابت الانقسام (pK) للسلاسل الجانبية (R).

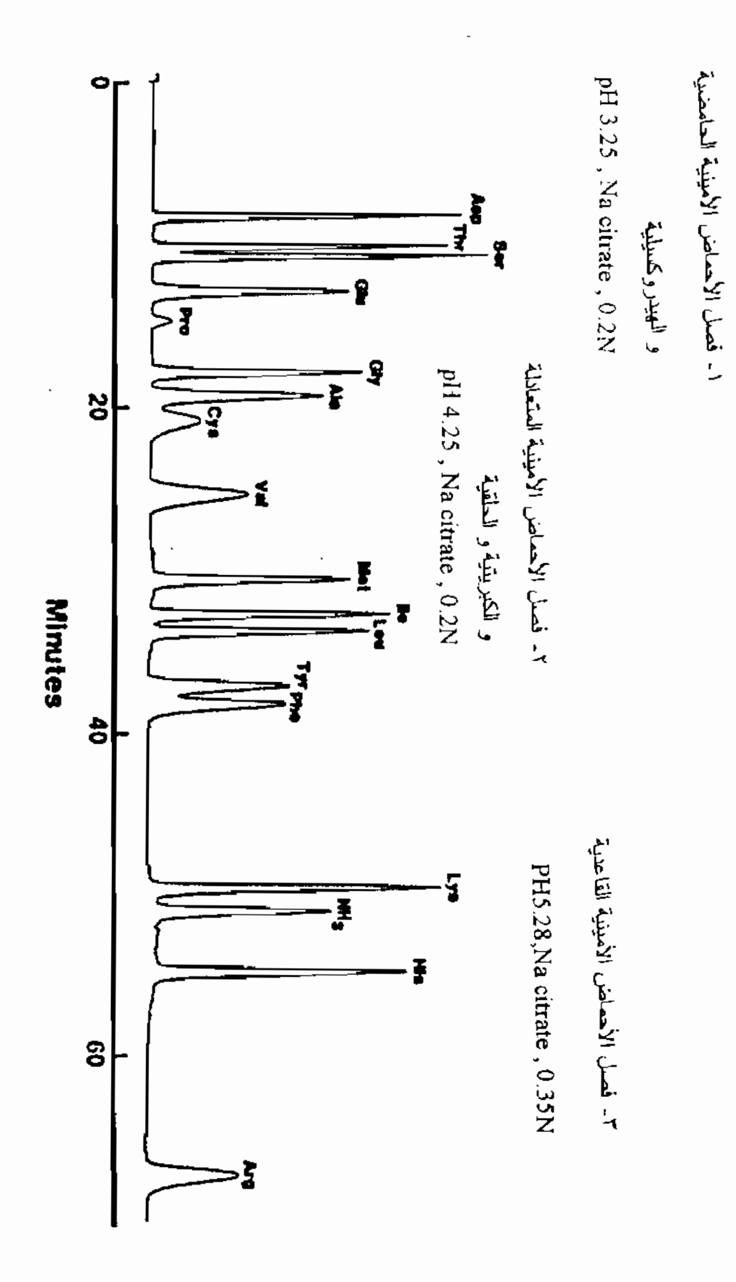
٢- تفاعل السلاسل الجانبية الكارهة للماء الخاصة بالمبادل الآيونى عديد الأستيرين مع الأحماض الأمينية. يضاف محلول حمضى (pH=3.0) من خليط الأحماض الأمينية إلى الراتنج فى الصورة الصوديومية. وعند درجة الحموضة هذه فإن جميع الأحماض الأمينية تحمل شحنة موجبة، أى لا يحدث تبادل آيونى أو ارتباط، فى حين تميل الأحماض الأمينية الكاتيونية Cation amino acids إلى أن تحل محل بعض أيونات

الصوديوم الموجودة فى جزيئات الراتنج. وأن كمية الإحلال Displace-ment تختلف بدرجة قليلة Slightly بين الأحماض الأمينية المختلفة نظراً للاختلافات فى درجة التأيين.

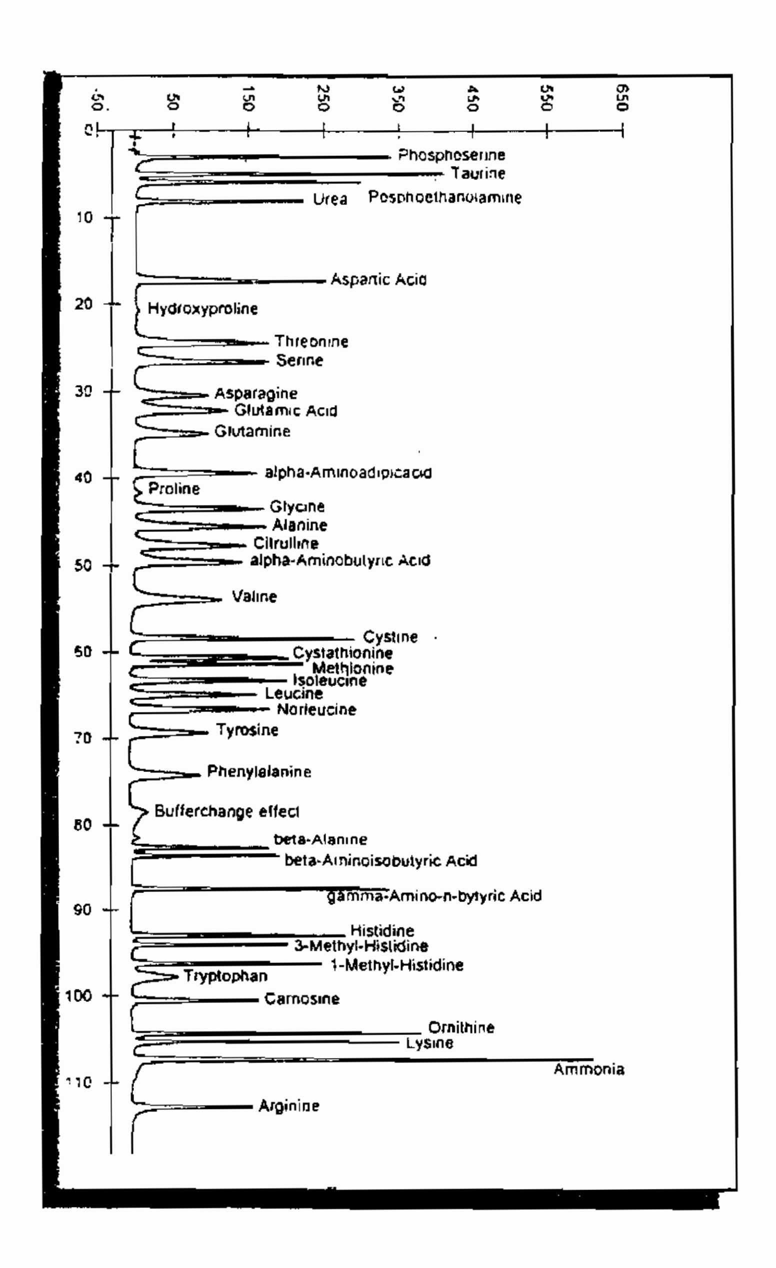
فعند درجة حموضة ٣ فإن أغلب الأحماض الأمينية القاعدية (ليسين- أرجنين- هستدين) ترتبط بقوة مع الراتنج بواسطة قوى الكتروستاتيكية، وتستخلص عند درجة حموضة ٩-١١. بينما أغلب الأحماض الأمينية الحمضية (جلوتاميك- أسبارتيك) ترتبط بقوة ضعيفة فيحدث احلال لها أولاً ثم يتبعها الأحماض الأمينية المتعادلة مثل الجليسين والفالين.

وحيث أن درجة حموضة محلول الإحلال Eluting solution ترتفع تدريجياً وكذلك تركيز كلوريد الصوديوم، فان الأحماض الأمينية تتحرك إلى أسفل العمود بمعدلات مختلفة بحيث تكون فى المقدمة الأحماض الأمينية الحمضية ثم المتعادلة ثم القاعدية. ويمكن جمعها على هيئة أجزاء صغيرة كثيرة Many small fractions والتى يجرى تقديرها كمياً بالتفاعل مع النهيدرين. والشكل التالى (صفحتى ١١١، ١١٢) يبين تتابع فصل الأحماض الأمينية.

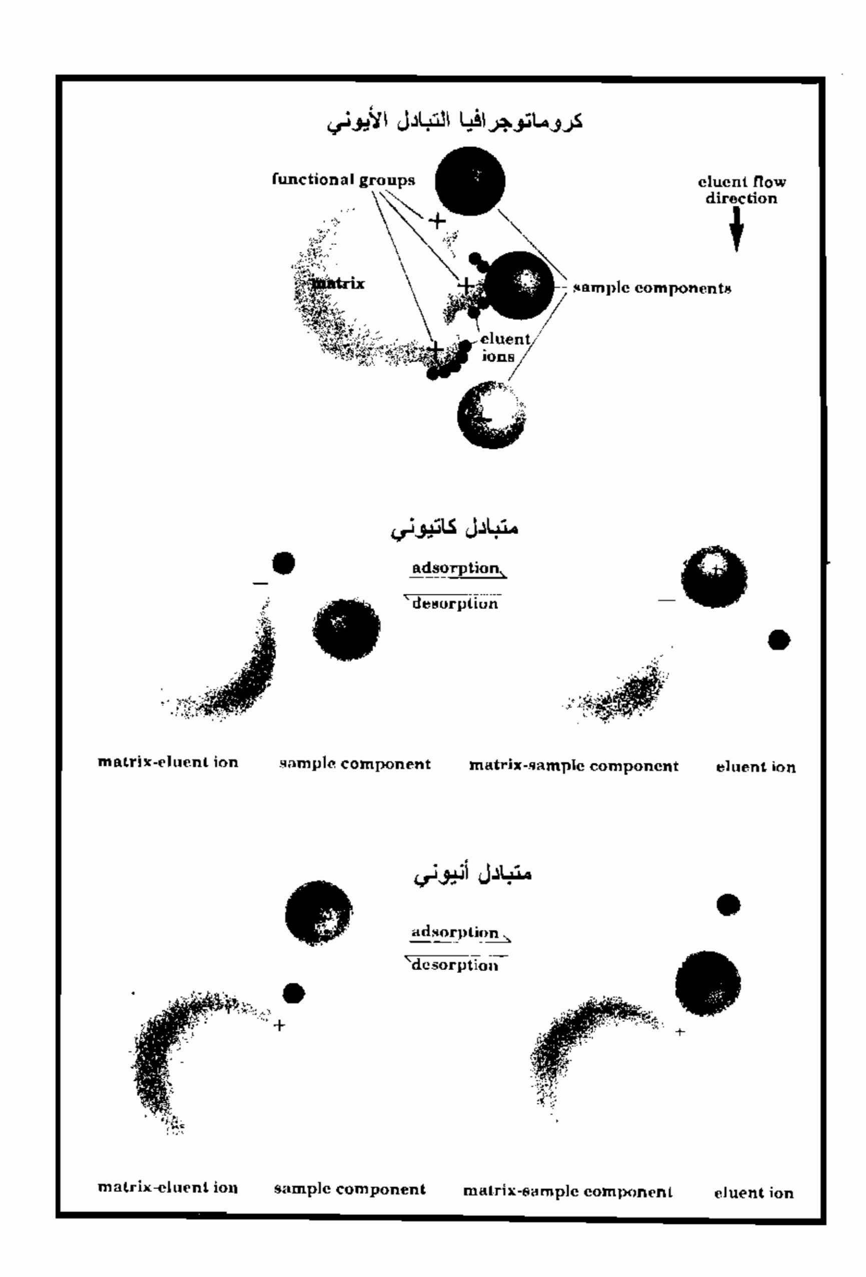
من المعروف أن بعض الأحماض الأمينية تحمل شحنة سالبة (حامضية) والبعض الآخر يحمل شحنة موجبة (قاعدية) وأن درجة حموضة الوسط تلعب دورا هاما فى اختلاف الشحنات على جزيئات الأحماض الأمينية- وفى حالة فصل الأحماض الأمينية بواسطة التبادل الأيونى يحدث ادمصاص عكسى Re-versible adsorption على جسم صلب Matrix مشحون (المتبادل الأيونى Ion exchanger) وتوجد بين الأحماض الأمينية والجسم الصلب اختلافات فى قوة الإدمصاص حيث تستخلص Elute بعض الأحماض الأمينية بسرعة والبعض الآخر ببطء معتمدة على عدد الشحنات المتاحة فى الأحماض الأمينية والجسم المختلف فى نوع الشحنة.



كروماتوجرام يبين تتابع فصل الأحماض الأمينية
الناتجة من التحليل المائى للبروتينات



الكروماتوجرام التالى يبين تتابع فصل الأحماض الأمينية وبعض المركبات الأمينية الموجودة عادة فى السوائل الحيوية بإستخدام محاليل منظمة سترات الليثيوم ذات درجات حموضة مختلفة.



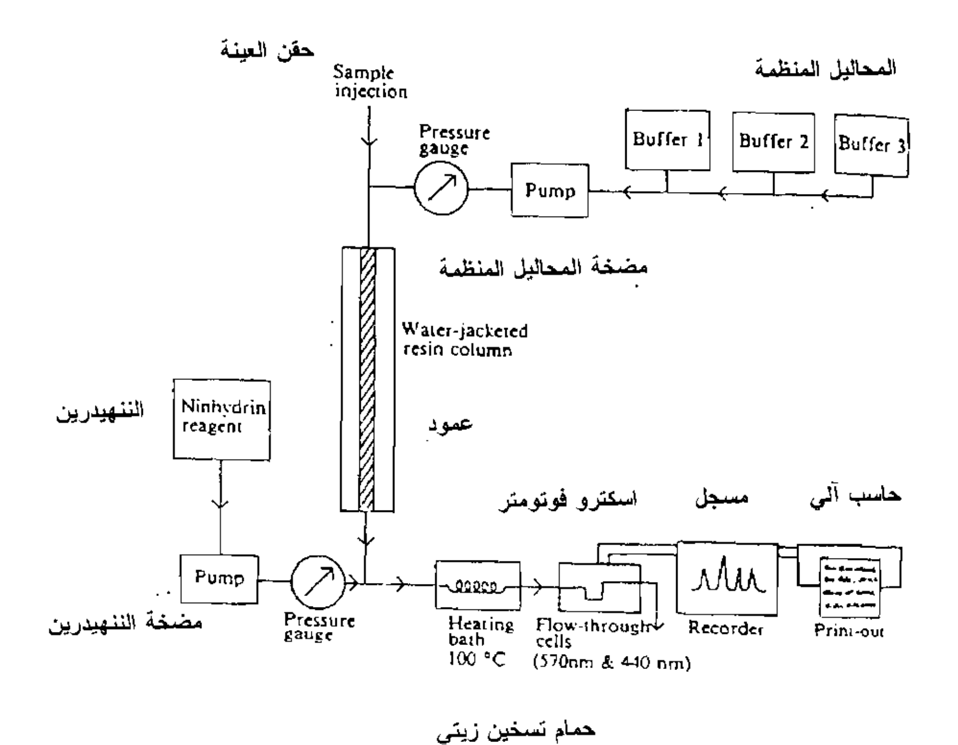
كروماتوجرافيا التبادل الأيوني
functional groups
eluent flow direction
matrix
sample components
eluent ions
متبادل كاتيوني
adsorption
desorption
matrix-eluent ion
sample component
matrix-sample component
eluent ion
متبادل أنيوني
adsorption
desorption
matrix-eluent ion
sample component
matrix-sample component
eluent ion

وفى حالة الإدمصاص العكسى Desorption فإن أيونات الطور المتحرك تتنافس مع الأحماض الأمينية فى العينة المدمصة على الجسم الصلب المخالف فى نوع الشحنة أو بمعنى آخر إن مكونات العينة المرتبطة على الجسم الصلب تتبادل مع أيونات الطور المتحرك الذى له نفس نوع الشحنة- تتم عملية الإدمصاص العكسى بالإستخلاص من نوع ايزوكراتيك Isocratic أى يستخدم طور متحرك ذو تركيب ثابت أثناء التحليل أو بطريقة أخرى أكثر شيوعا وهى الإستخلاص المتدرج Gradient elution أى يتغير تركيب الطور المتحرك أثناء الفصل وهذه الطريقة لا غنى عنها Indispensable لفصل العينات الحيوية المعقدة.

والجدير بالذكر إن معظم المتبادلات الأيونيه يمكن إستخدامها مرة أخرى Reusable بعملية الإسترجاع Regeneration أى التخلص من الأيونات المرتبطة أى يجرى استبدالها لإستعادة Restore الظروف لفصل آخر. وتجرى عملية الإسترجاع بواسطة محاليل منظمة ذات تركيز عالى ويلى عملية الإسترجاع اتزان للعمود Column equilibrium بإمرار المحلول المنظم الأول خلال العمود المسترجع.

ثامنا: جهاز تحليل الأحماض الأمينية Amino acid analyzer

تقدر الأحماض الأمينية وصفياً وكمياً باستخدام عمود يحتوى على راتنج التبادل الآيونى ويمرر خلاله الطور المتحرك حاملاً معه الأحماض الأمينية المفصولة كل على حدة ثم يتفاعل مع النهيدرين ويتكون معقد لونى. والجهاز يعتمد أساساً على ضخ Pumped محاليل منظمة تختلف فى درجة حموضتها أو قوتها الآيونية Ionic strength خلال عمود الراتنج Resin column المزود بترموستات لضبط درجة حرارته. وقد حدث تطور فى الجهاز باستخدام راتنجات



رسم تخطيطى لجهاز تحليل الأحماض الأمينية بإستخدام النتهيدرين للتقدير الكمى

ذات نوعية عالية ونظام للحقن الآلى، مع أنظمة للكشف ذات حساسية عالية. وهذا أدى إلى تقليل وقت التحليل من أيام إلى ساعات. بالإضافة إلى تقديرها كمياً حتى وإن كان تركيز الأحماض الأمينية أقل من ١٠ $^{-٩}$ مولر.

الشكل التخطيطى التالى يبين أجزاء جهاز تحليل الأحماض الأمينية وهى:-

١- محاليل منظمة ذات درجة حموضة مختلفة عادة يستخدم ثلاث محاليل منظمة ١، ٢، ٣ لها درجة حموضة ٣,٢٥، ٤,٢٥، ٥,٢٨ على التوالى وتعمل كطور متحرك لإحلال الأحماض الأمينية.

٢- مضخة لدفع المحاليل المنظمة داخل العمود Buffer pump.

٣- وسيلة لحقن العينة Sample injection.

٤- عمود راتنج وبه وسيلة لضبط وثبات درجة حرارة الفصل Resin column.

٥- مضخة لدفع الجوهر الكشاف ننهيدرين Ninhydrin pump.

٦- حمام زيتى Reaction coil.

٧- خلية لتقدير الكثافه اللونية للمحلول Flow cell عند الطولين الموجين ٥٧٠ و٤٤٠ نانوميتر.

٨- مسجل أو حاسب آلى Computer.

يتم الفصل داخل عمود يحتوى على مبادل كاتيونى قوى مثل (Sulphonated polystyrene resin) والذى له طبيعة تبادل أنيونى قوى ($-SO_3^-$)، وعند درجة الحموضة المنخفضة تحمل جميع الأحماض الأمينية شحنة موجبة وتنجذب إلى المجاميع السلفونية المحملة بالشحنة السالبة.

عند رفع درجة حموضة المحلول المنظم (الطور المتحرك) الذى يمر خلال العمود فإنه يحل Elute الأحماض الأمينية بمعدلات مختلفة حيث تنفصل الأحماض الأمينية بالتتابع على أساس قيم الـ PI لكل واحد منها. فعند درجة pH

٢,٥ (درجة حموضة الوسط التى يبدأ عندها الفصل) نجد أن الأحماض الأمينية التى تحتوى على مجموعة حامضية (COOH-) زائدة فى سلاسلها الجانبية لها تآلف قليل جداً مع المبادل وبالتالى هى أول الأحماض التى تخرج من العمود. عند نفس درجة حموضة الوسط المنخفضة (٢,٥) نجد أن الأحماض الأمينية التى تحتوى فى سلاسلها الجانبية مجموعات قابلة للتأين والتى تحمل شحنة موجبة مثل الليسين والهستدين ترتبط بقوة مع المبادل وتستخلص فقط من العمود عندما ترتفع درجة حموضة الوسط بدرجة كبيرة حيث تنخفض شحناتها الموجبة. يمتزج المحلول الخارج من العمود النهيدرين (الجوهر الكشاف) ويسخن الخليط Effluent (محلول الحمض الأمينى المفصول ومحلول النهيدرين) على درجة ١٠٥°م حيث يظهر لون تقاس شدته عند الطولين الموجبين ٥٧٠ و٤٤٠ نانوميتر.

ملخص لطريقة الفصل

١- يحقن خليط قياسي من الأحماض الأمينية وبعد إنتهاء التحليل يظهر تقرير يبين عدد الأحماض الأمينية القياسية R_t لكل حمض أمينى ومساحات الـ peaks المقابلة للأحماض الأمينية.

٢- يزود الحاسب الآلى بالـ R_t لكل حامض امينى قياسي وتركيزه.

٣- يحسب آليا معامل الاستجابة Response factor

بقسمة التركيز ÷ المساحة لكل حامض أمينى

$$Amount / area = RF$$

تحقن العينة – يقوم الحاسب الآلى اوتوماتيكيا بكتابة تقرير يبين فيه اسم الحمض الأمينى (من المعلومات السابق تغذيته بها)، الـ R_t، التركيز بالـ nM حيث تضرب المساحة فى معامل الاستجابة لكل حمض أمينى.

٤- يحول تركيز الحمض الأمينى من nM الى ng بالضرب فى الوزن الجزيىء للحمض الأمينى.

٥- يحسب تركيز الحمض الأمينى على أساس ٪ mg أو أى نوع آخر للدلالة على التركيز. يجب الأخذ فى الاعتبار أى تخفيف أجرى أثناء التحليل.

٨-١ ملاحظات عامة عن فصل الأحماض الأمينية

العمـــود Column

من المعروف أن قاعدة الـ Peak تتناسب طردياً مع الجذر التربيعى لطول العمود، فإن الأعمدة المستخدمة المصنوعة من الصلب غير القابل للصدأ والتى طولها ٢٠ سم ومعبدأة بمبادل كاتيونى قوى تعطى Peaks ذات قواعد ضيقة، وقيم عالية لارتفاع الـ Peak، أى تفصل بوضوح الأحماض الأمينية ذات التركيب الكيميائى المتقارب.

المحاليـــل المنظمـــة Buffers

يجب إمرار تيار من النيتروجين لمنع وجود فقاقيع فى المحاليل المنظمة أثناء سريانها، ويجب أن يكون التركيب ودرجة حموضة الوسط مضبوطة إلى ٠,٠٠١ مول/ لتر و ٠,٠١ وحدة pH. وفى حالة الأجهزة التى يستخدم فيها عمود واحد Single column فإن تتابع الفصل يعتمد على سلسلة من المحاليل المنظمة والتى ترتفع فيها درجة حموضة الوسط عن درجة حموضة محلول البداية (٢,٣). وتستخدم سترات صوديوم أو سترات الليثيوم مصحوبة بمنظف صناعى (Brij 35) ومادة مضادة للأكسدة (Thiodiglycol) ومادة حافظة (حامض الكابريليك) ويستخدم الاحلال المرحلى Stepwise elution وفيها تدفع المحاليل المنظمة خلال العمود لفترات مختلفة بالاعتماد على نوعية الأحماض الأمينية

المراد فصلها. والمحاليل المنظمة المستخدمة لها درجات pH ٣,٢٥، ٤,٢٥، ٥,٢٨، ١٠ سواء بتركيزات مولارية ثابتة أو متغيرة لفصل الأحماض الأمينية الحمضية والمتعادله والقاعديه.

درجة الحرارة Temperature

يجب أن تكون درجة حرارة المبادل داخل العمود ثابتة حتى يمكن التغلب على التغيرات فى درجة الـ pH للمحاليل المنظمة وأيضا تأين الأحماض الأمينية. وبصفة عامة فإن زيادة درجة الحرارة تؤدى إلى سرعة الاحلال وإلى تغير نسبى فى موضع الحمضى الأمينى الذى يجرى احلاله وبالتالى يؤدى الى صعوبة تفسير النتائج. وعادة درجة الحرارة المختارة هى ٦٠°م ومع ذلك فان درجات الحرارة الأقل من ذلك تكون مطلوبة فى بعض الأحيان لفصل الأحماض الأمينية المتقاربة فى التركيب الكيميائى.

معدل السريان Column flow rate

يتطلب الفصل الناجح والحصول على نتائج متطابقة بتكرار التقدير أن يكون معدل سريان المحلول المنظم ثابتاً باستخدام ضغط ثابت أو مضخة دفع ثابتة. ويصمم هذا النوع من المضخات بأن تدفع المحاليل المنظمة بمعدل ثابت. ويعتمد اختيار معدل السريان على أساس نوع المبادل الكاتيونى وأبعاد العمود.

تحضير العينة Sample preparation

يختلف حجم العينة المحقون داخل العمود على حسب أنواع الأجهزة المتوافرة تجارياً. ففى حالة الأجهزة القديمة يتطلب حجم كبير من العينة (١ مل) نظراً لحساسيتها القليلة. وفى حالة الأجهزة الحديثة تحقن حجوم قليلة، عادة ٥٠ ميكرولتر أو أقل. ويجب معرفة أن تحضير العينة المضبوط يؤدى إلى الحصول

على نتائج متطابقة وهذا يعتمد على طبيعة العينة ومكوناتها. ويجب أن يكون محلول العينة المحقون نظيفا خال من البروتينات والجزيئات الأخرى الكبيرة. وفى حالة الفشل للوصول إلى هذه المتطلبات فإنه يؤدى إلى إنسداد الفلتر Frit الموجود أعلى عمود المبادل الكاتيونى، وبالتالى يصبح من الضرورى التخلص من المبادل وتنظيف وإعادة تعبئة العمود مرة أخرى، وهى خطوات شاقة. وبصفة عامة فإن العينات السائلة Liquid يلزم لها فقط عملية ترشيح أو طرد مركزى ولإزالة البروتينات Deproteinization فإنه يلزم ترسيبها بواسطة حمض البكريك أو حمض سلفوساليسيليك أو باستخدام (الفرز الغشائى) Dialysis أو الترشيح الفوقى. وفى حالة العينات الصلبة Solid مثل الأنسجة النباتية أو الحيوانية أو الأطعمة فإنه يتطلب التجانس فى الاستخلاص والتخلص من البروتينات. وفى حالة الببتيدات والبروتينات فانه يلزم إجراء التحليل المائى.

أولا: للحصول على الأحماض الأمينية الحرة.

يجب عند حقن العينة أن تكون مذابة فى محلول منظم ذو درجة حموضة ٢,٢ قبل بدأ فصل الأحماض الأمينية، وبعد عملية فصل واحلال جميع الأحماض الأمينية فإنه يلزم إجراء عملية إسترجاع Regeneration للمبادل الكاتيونى قبل حقن العينة التالية بإمرار محلول صودا كاوية ذو درجة حموضة ١٠. وفى الأجهزة الحديثة فإنه يتم الحقن آليا بعد تمام تحليل العينة السابقة وضخ المحلول المنظم من البداية للعينة التالية.

الكشف Detection

تعمل المضخة الثانية بالجهاز على ضخ معدل ثابت من الجوهر الكشاف ليقابل المحلول الخارج من العمود، وعند تمام التفاعل فانه تقاس الكثافة اللونية باستخدام خلية Flow cell بواسطة جهاز تقدير الألوان أو قياس الفلورة -Fluo

rimeter. وعادة يستخدم الجوهر الكشاف النهيدرين بعد أن يمر على ملف يسخن فى حمام زيتى على درجة ١٠٠°م. ويتعين الامتصاص على طولين موجيين ٥٧٠ و ٤٤٠ نانوميتر للأحماض الأمينية والأيمينية على التوالى. يذاب النهيدرين فى ايثيلين جليكول (خال من البيروكسيدات) وأحادى ميثايل إيثر (ميثايل سيليلوسولف Methyl cellulosolve) باستخدام محلول منظم الخلات عند درجة حموضة ٥,٥. ويمرر تيار من النيتروجين أثناء تحضير الجوهر الكشاف للتخلص من الهواء، وتضاف كمية قليلة من مادة مختزلة مثل كلوريد القصيدروز أو كلوريد التيتانوس Titanious chloride بحيث تكفى لتكوين كمية معينة من النهيدرين المختزل. ويكون لون الجوهر الكشاف ذو لون أصفر فاتح، ويجب تخزينه فى زجاجة بنية وتحت ضغط من النيتروجين نظرا لأن النهيدرين حساس للضوء والأكسجين.

يحتاج تفاعل النهيدرين إلى حرارة ولذلك يمر خليط المحلول الخارج من العمود وجوهر النهيدرين خلال ملف Reaction Coil من التفلون ذو قطر صغير (١ مم) ويظل على درجة حرارة ١٠٠°م فى حمام زيتى. ويجب التأكد من أن السريان غير معاق، حيث أن الحرارة الزائدة تؤدى الى ترسيب النهيدرين فى الملف ذو القطر الضيق مما يؤدى إلى اغلاق الجهاز تماما Stoppage.

وهناك بعض الأجهزة الحديثة تعتمد على استخدام تفاعل الفيثالدهيد، وهو يشابه تقريباً تفاعل النهيدرين فى كثير من الأحوال. فمثلا الجوهر الكشاف الفيثالدهيد ثابت وهو يذوب فى الماء وبالتالى يمكن الاستغناء عن الكيماويات السامة مثل التى تستخدم فى تحضير النهيدرين، كما لا يحتاج الأمر إلى التخزين فى جو من النيتروجين. ونظراً لأن تفاعل الفيثالدهيد يحدث بسرعة عند درجة حرارة الغرفة فإن الأمر لا يحتاج إلى التسخين على درجة ١٠٠°م فى الحمام الزيتى وبالتالى يمكن التغلب على المشاكل المتعلقة بهذه النقطة. ونظراً

لزيادة الحساسية باستخدام تفاعل الفيثالدهيد، فإنه يمكن الكشف عن تركيزات من الأحماض الأمينية تصل إلى البيكومول picomol (١٠^-١٢^).

٨-٢- تقدير الأحماض الأمينية كميا Quantitation

تختلف كثافة اللون أو الفلورة الناتجة من مول واحد من الحمض الأمينى اختلافا قليلا جداً تبعاً لنوعية الأحماض الأمينية. ولهذا ينتج عن حقن مخلوط من الأحماض الأمينية الذى يحتوى على تركيزات متساوية من كل حمض أمينى (٢٠٠ نانومول/ مل) مساحات متساوية من الـ Peaks.

يجب استخدام مادة قياسية داخلية Internal standard لكل عملية تحليل، وهذه المادة هى عبارة عن حمض أمينى غير موجود فى العينة التى يجرى تحليلها. فمثلا عند تحليل عينة بلازما الدم يستخدم نورليوليسين أو ألفا أمينو بيتا جوانيدينو حمض البيوتيريك كمواد قياسية داخلية ويجب أن تضاف بتركيز معلوم إلى العينة قبل تجهيزها وتحليلها. وعند معرفة كمية المادة القياسية فإنه يمكن معرفة تركيز الأحماض الأمينية فى العينة عن طريق معرفة مساحات الـ peaks للمادة القياسية والعينة. وفى هذه الطريقة يمكن التغلب على المشاكل التى تنشأ من فقد كمية من العينة أثناء التحضير. وكذلك اختلاف الكثافة اللونية للمحاليل المحضرة مثل النهيدرين وكذلك التغيرات فى ظروف التحليل.

ويمكن حقن خليط من الأحماض الأمينية معلوم تركيز كل حمض أمينى كل على حدة (External standard) ومنه يمكن حساب كمية أى حمض أمينى فى العينة من الحسابات التالية:-

أولاً: استخدام محلول خليط الأحماض الأمينية القياسية

عند حقن كمية معلومة من هذا الخليط فإنه يمكن استنتاج حسابياً معامل الاستجابة Response factor (RF) لكل حمض أمينى بمعرفة تركيز الحمض ومساحة الـ peak الخاص به.

معامل الاستجابة (RF) = التركيز ÷ مساحة الـ peak

ثانيا: يعرف تركيز الحامض الأميني بعد حقن العينة من المعادله التالية:-

التركيز = مساحة الـ peak x معامل الاستجابة .

تاسعاً: تطبيقات عامة علي تحليل الأحماض الأمينية Applications

٩-١: استخدام تركيب الأحماض الأمينية لتتبع نضج البذور

المثال التالى يبين تركيب الأحماض الأمينية لبذور الفلفل فى تتبع مراحل نضج قرون الفلفل (أخضر– خضر مخطط بلون أحمر– أحمر) .

الحمض الأمينى	بـــذور الفلفـــل		
	ثمار خضراء	ثمار خضراء مخططة بلون احمر	ثمار ناضجة حمراء
ليسين	٣,٢٥	٣,٨٣	٤,٣٤
هستدين	١,١٤	١,٦٥	١,٨٠
أرجنين	٣,٣١	٦,٥١	٨,١٨
اسبارتيك	٩,٣٦	٨,٥٠	٨,٩٥
ثريونين	٢,٨٤	٣,٣٧	٣,٧٥
سيرين	٣,٢٩	٤,٢٨	٤,٦٠
جلوتاميك	١٠,٧٩	١٣,٨٤	١٦,٢٧
برولين	٢,٤٧	٣,٣٠	٣,٦٦
جليسين	٢,٨٣	٣,٢٨	٤,٤٧
آلانين	٢,٩٥	٣,٦٩	٤,٠٧
فالين	٣,٠٤	٣,٧٤	٤,٢٣
ميثونين	٠,٩٣	١,١٠	١,٢٨
أيزوليوسين	٢,٤١	٢,٩١	٣,٣٢
ليوسين	١,٠٨	٤,٩٧	٣,٦٩
تيروزين	١,٤٩	١,٨٣	٢,٢١
فينايل آلانين	٢,٥٩	٣,٤٩	١٠,٦

يظهر هذا الجدول زيادة فى كميات الأحماض الأمينية لبذور الفلفل خلال فترات النضج وبصفة خاصة أحماض الأرجنين والجلوتاميك مما يبين أهمية هذين الحمضين فى تكوين بعض الأحماض الأمينية الأخرى بالإضافة الى تكوين الأحماض النيكلوتيدية وبعض القواعد الأميدية (Farag et. al. 1982).

٩-٢- استخدام تركيب الأحماض الأمينية في تمييز الجنس

يبين المثال التالى تركيب الأحماض الأمينية فى أوراق نباتى الباباظ والجوجوبا المذكرة والمؤنثة.

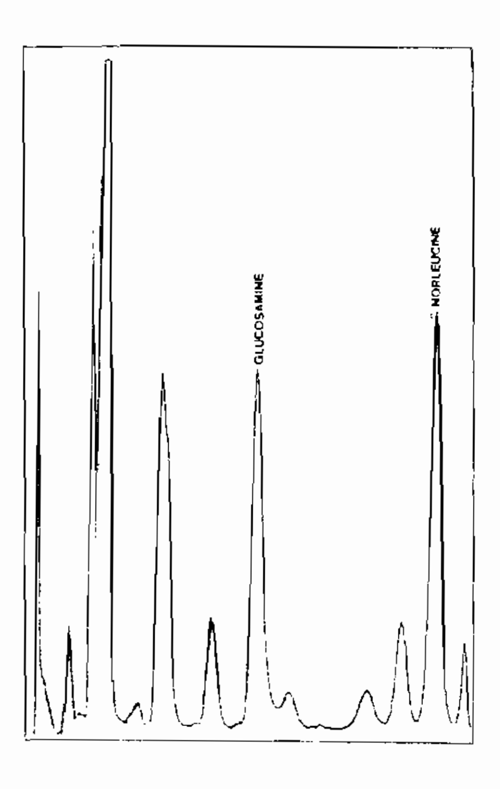
الحمض الأمينى	أوراق نبات الجوجوبا		أوراق نبات الباباظ	
	المذكرة	المؤنثة	المذكرة	المؤنثة
اسبارتيك	٠,٢٠	٠,٣٢	١,٥٤	١,٩٠
ثريونين	٠,٠٥	٠,٠٦	٠,٣٠	٠,٥٢
سيرين	٠,٠٨	٠,١٣	٠,٤٠	٠,٤٦
جلوتاميك	٠,٢٠	٠,٣٤	١,٠٨	١,٢٤
برولين	٠,٠٨	٠,١٣	٠,٣٦	٠,٣٩
جليسين	٠,١٣	٠,٢٥	٠,٥٦	٠,٦٣
آلانين	٠,٠٣	٠,١٨	٠,١٢	٠,١٥
سستين	–	٠,٠١	–	٠,١٧
فالين	٠,٠٤	٠,٦٧	–	٠,٠٢
ميثونين	٠,٠١	٠,٠٢	٠,١٦	٠,١٦
أيزوليوسين	–	–	–	–
ليوسين	٠,٠٣	٠,٠٧	٠,٣٢	٠,٣٤
تيروزين	٠,١٣	٠,١٢	٠,٤٣	٠,٥٠
فينايل آلانين	٠,٠٢	٠,١٦	٠,١٨	٠,٢٢
هستدين	٠,٠٩	٠,٠٣	٠,٧٥	٠,٥٥
ليسين	–	٠,٠٩	–	–
أرجنين	٠,٠٧	–	٠,٢٨	٠,٢٣

تظهر النتائج السابقة أن أوراق نبات الجوجوبا المؤنثة تتميز بوجود حمض السستين وغياب الأرجنين بالمقارنة بأوراق الجوجوبا المذكرة بينما أوراق الباباظ المؤنثة تتميز بوجود أحماض السستين والفالين التى لا توجد فى أوراق النباتات المذكرة وبصفة عامة فان الأوراق المؤنثة فى النباتين تحتوى على كميات أكبر من الأحماض الأمينية الموجودة بالأوراق المذكرة (Farag et. al., 1987).

٤-٣- الكشف عن تلوث الطعام بالسموم الفطرية

إن احتواء الأطعمة على مكونات فطرية يسبب مخاطر على صحة الانسان نتيجة لوجود السموم الفطرية. توجد طريقة لمعرفة وجود الفطريات وهى طريقة هاورد للعد الميكروسكوبى Haward Mould Count إلا أن هذه الطريقة تحتاج إلى تدريب خاص وخبرة فى إستخدام الميكروسكوب وحديثا وضعت طرق تحليلية تعتمد على تقدير الشيتين Chitin الذى هو متبلمر من S-1,4-N-acetyl glucose amine linked ومن المعروف أن مركب الشيتين هو أحد مكونات الجدار الخلوى للفطر وعلى ذلك يمكن استخدام هذا المركب كدليل Indicator على التلوث الفطرى فعند إجراء التحليل المائى الحامضى للشيتين فإنه ينتج جلوكوزامين الذى يمكن بسهولة الكشف عنه وتقديره كميا بواسطة جهاز تحليل الأحماض الامينية كما فى الكروماتوجرام بصفحة (١٢٧).

والطريقة المثلى للحصول على أعلى تركيزمن الجلوكوز أمين هو إجراء تحليل مائى للعينة تحت مكثف عاكس بإستخدام ٦ ع حمض هيدروكلوريك لمدة ٢-٤ ساعات على درجة ١١٠°م- ووجدت علاقة خطية بين كمية الفطر وتركيز الجلوكوز أمين (Cousin et.al., 1984).



(كروماتوجرام يبين عينة طماطم ملوثة بفطر)

٩-٤- التقييم الغذائي لبعض البذور seeds والنقل nuts

يتم هذا التقييم عن طريق استخدام المقياس الكيميائى Chemical score كدليل على القيمة الغذائية للبروتين Nutritional value.

يتم ذلك بمقارنة نموذج Pattern الأحماض الأمينية الأساسية Essential بعد التحليل المائى لعينة الطعام بنموذج الأحماض الأمينية اللازم لاحتياج الإنسان الحقيقى Real human need والذى يسمى النموذج المرجعى أو المثالى Ideal or reference pattern مثل لبن الإنسان وبروتين البيض.

ويحسب المقياس الكيميائى على أساس أنه النسبة بين تركيز الحمض الأمينى **المحدد** فى العينة إلى تركيز الحامض الأمينى المقابل له فى البروتين المرجعى (مجم حمض أمينى/ جرام بروتين) ثم الضرب فى ١٠٠.

لذلك يتبع الخطوات التالية لحساب المقياس الكيميائى.

١- حساب تركيز الحمض الأمينى الأساسى على أساس مجم/ جم بروتين العينة ويعطى له الرمز (a)

mg amino acid/ 1 g sample protein (a)

٢ - قسمة (a) على تركيز الحمض الأمينى القياسى المقابل له فى البروتين المرجعى.

mg amino acid in sample protein/ mg amino acid in reference protein

٣- يعين الحمض الأمينى المحدد (اللازم لتخليق البروتينات) وهو الذى يوجد بأقل نسبة بالمقارنة بجميع نسب الأحماض الأساسية.

٤- يحسب المقياس الكيميائى للدلالة على القيمة الغذائية للبروتين بضرب تركيز الحماض الأمينى المحدد x ١٠٠.

وبعبارة أخرى فإن الحمض الأمينى الذى به نقص Deficient عن احتياج الإنسان هو الحمض الموجود بتركيز أقل من الحمض الأمينى المناظر الموجود فى البروتين المرجعى ويسمى الحمض الأمينى الناقص Deficient amino acid. الحمض الامينى الذى يوجد بأقل نسبة يسمى الحمض الامينى المحدد Limiting amino acid، أى عند قسمة تركيزات جميع الأحماض الأمينية الأساسية فى العينة على التركيزات المقابلة من الأحماض الأمينية فى البروتين المرجعى فإن أقل نسبة لحمض أمينى معين هو الحمض الأمينى المحدد.

لتعيين الأحماض الأمينية التى يقل تركيزها عن الأحماض الأمينية فى البروتين المرجعى (الناقصة Deficient) والأحماض الأمينية المحددة ثم Chemical score (C.S) فى بروتين فول الصويا والقمح يتبع الخطوات التالية :-

- يقسم تركيز كل حمض أمينى فى العينة على تركيز الحمض المقابل فى البروتين القياسى FAO، يتبين أن أقل نسبة هى (٢٩ ÷ ٣٥) ٠,٨٣ لمجموع الحمضين الأمينين سستئين ومثيونين فى بروتين فول الصويا وبالتالى يعتبر هذان الحمضان هما العاملان المحددان، وأن C.S هو ٨٣ (٠,٨٣ X ١٠٠) لبروتين فول الصويا. ولا توجد أحماض أمينية ناقصة Deficient، أى التى يكون تركيزها أقل عن التركيز المقابل فى الأحماض الأمينية للبروتين المرجعى.

تركيز الأحماض الأمينية الأساسية لبعض البروتينات (مجم/ جم بروتين)

الحمض الأمينى الأساسى	البيض	لبن الانسان	بروتين مرجعى طبقا للFAO (أ)	القمح (ب)	ب/أ	فول صويا (جـ)	جـ/أ
ثريونين	٤٧	٤٥	٤٠	٣٣	٠,٨٢٥	٤١	١,٠٥٢
سستئين+ ميثيونين	٥٧	٣٥	٣٥	٣٦	١,٠٢٨	٢٩	٠,٨٢٨
فالين	٦٦	٥٤	٥٠	٤٧	٠,٩٤	٥٠	١,٠٠
أيزوليوسين	٥٤	٤٧	٤٠	٣٧	٠,٩٢٥	٤٥	١,٢٥
ليوسين	٨٦	٩٥	٧٠	٧٢	١,٠٢٨	٧٦	١٠,٨٥
تيروزين+ فينايل آلانين	٩٣	٧٢	٦٠	٨٦	١,٤٣٣	٩٣	١,٥٥
هستدين	٢٢	٢٦	-	٢٥	-	٢٧	-
ليسين	٧٠	٧٠	٥٥	٣٢	٠,٥٨١	٦٥	١,٠١٨١
تربتوفان	١٧	١٧	١٠	١٤	١,٤	١٣	١,٣
المقياس الكيميائى			١٠٠	٥٨	-	٨٣	

حمض أمينى محدد Limiting

حمض أمينى ناقص التركيز Deficient

– وبنفس الطريقة فى حالة القمح يتبين أن الحمض الأمينى ليسين هو المحدد وأن الـ C.S لبروتين القمح هو (٣٢ ÷ ٥٥ × ١٠٠) ٥٨ وأن الأحماض الأمينية الناقصة Deficient هى الثريونين، فالين، ايزوليسين هذا بالإضافة الى الليسين. وطبقا لتقارير الهيئات العلمية العالمية الخاصة بالتغذية والصحة (WHO/FAO) فإن تركيز كل حمض أمينى أساسى (جم حمض أمينى أساسى/ ١٠٠ جم بروتين) اللازم لتغذية الإنسان هى كما يلى:-

الحامض الأمينى الأساسى	التركيز (مج/ جم بروتين)	التركيز (جم/ ١٠٠جم بروتين)
ليسين	٥٥	٥,٥
ميثيونين + سستئين	٣٥	٣,٥
ثريونين	٤٠	٤,٠
أيزوليوسين	٤٠	٤,٠
ليوسين	٧٠	٧,٠
فالين	٥٠	٥,٠
فينايل الآنين + تيروزين	٦٠	٦,٠
تريتوفان	١٠	١,٠
هستدين	٢٦	٢,٦

والمثال التالى يبين أيضا كيفية معرفة الأحماض الأمينية المحددة والمقياس الكيميائى للبروتين فى نباتى الحمص والفول.

أولا: تركيب الأحماض الأمينية (جم/ ١٠٠ جم بروتين) فى نباتى الفول والحمص.

تركيب الأحماض الأمينية	البروتين المرجعىR (جم ٪)	الحمص		الفول	
		التركيز (جم ٪) S_1	S1/R	التركيز (جم ٪) S2	S2/R
أسبارتيك	–	١١,٦	–	١١,٢	–
• ثريونين	٤	٣,٤	٠,٨٥أ	٣,٠	٠,٧٥ب
سيرين	–	٤,٨	–	٤,٦	–
جلوتاميك	–	١٧,٨	–	١٨,٣	–
برولين	–	٤,٣	–	٤,٢	–
جليسين	–	٣,٩	–	٣,٧	–
آلانين	–	٤,١	–	٤,١	–
• فالين	٥	٤,٣	٠,٨٦ب	٤,٩	٠,٩٨ج
أيزوليوسين	٤	٤,٦	١,١٥	٤,٤	١,١
• ليوسين	٧	٧,٦	١,٠٩	٧,٧	١,١
• تيروزين	٦	٢,٨	١,٣٨	٢,٩	١,٤٢
• فينايل آلانين	–	٥,٥	–	٥,٦	–
• ليسين	٥,٥	٦,١	١,١١	٦,٣	١,١٥
هستدين	٢,٦	٢,٤	٠,٩٢	٢,٦	١,٠
أرجنين	–	٩,١	–	٦,٨	–
• ميثيونين	–	١,٧	٠,٩٤ج	١,٤	٠,٦٠أ
• سستئين	٣,٥	١,٦	–	٠,٧	–
• تريتوفان	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠

تمثل النسبة S/R خارج قسمة تركيز الحمض الأمينى فى العينة على تركيز الحمض الأمينى المقابل فى البروتين المرجعى.

تمثل الحروف أ، ب، جـ الأحماض الأمينية المحددة الأولى والثانية والثالثة على التوالى

تدل العلامة • على الحمض الأمينى الأساسى.

ثانياً: تعيين الأحماض الأمينية المحددة والمقياس البروتينى لبعض البقوليات

المصدر النباتى	المقياس البروتينى	الأحماض الأمينية المحددة		
		الأول	الثانى	الثالث
٨٥	٨٥	ثريونين	فالين	ميثيونين + سستئين
٦٠	٦٠	ميثيونين+ سستئين	ثريونين	فالين

وهناك مقياس آخر لمعرفة القيمة الغذائية لأى مادة غذائية وهو مقارنة كمية كل حمض أمينى أساسى (A) منسوبا الى الكمية الكلية للأحماض الأمينية الأساسية (E) أى النسبة A:E .

٩-٥ تقييم بروتين الأغذية Evaluation of food protein quality

يعتمد هذا التقييم على مقياس الحمض الأمينى Amino acid score (يعتمد على كمية حمض أمينى واحد وهو الحمض الأمينى المحدد) ويؤخذ فى الاعتبار معامل تصحيح وهو الهضم الحقيقى للبروتين Protein true digestability الذى يقدر بطريقة ميزان الفأر Rat balance .

ولتقييم كمية الأحماض الأمينية المناسبة Adequacy فى أغذية الأطفال فإنه تستخدم طريقة تعتمد على نوعية وكمية البروتين، ولذلك يستخدم اصطلاح معدل الحمض الأمينى Amino acid rating وهو يستنتج من حاصل ضرب مقياس الحمض الأمينى × النسبة المئوية كما فى المعادلة

Amino acid rating = Amino acid score x protein (g/100 kcal)

ويستنتج اصطلاح آخر وهو معدل الحمض الأمينى النسبى لتقدير مدى نوعية أغذية الأطفال من المعادلة التالية:-

Relative amino acid rating =

$$\frac{\text{Amino acid rating of test formula x 100}}{\text{Amino acid rating of human milk}}$$

يبين المثال فى صفحة ١٣٤ كيفية حساب المقياس الكيميائى ومعدل الحمض الأمينى فى عينتين (مسحوق ١، ٢ وسائل ١، ٢).

٩-٦ تأثير التركيب الفراغى للأحماض الأمينية على القيمة الغذائية للبروتين

من المعروف أن كل حمض أمينى يحتوى على ذرة كربون غير متناسقة asymmetric وبالتالى فانه يوجد فى صورتين متشابهتين وهما اليسارية (L) واليمينية (D) وتسمى Enantiomers وبصفة عامة فإن الأحماض الأمينية اليسارية تتحد مع بعض وتكون ببتيدات وبروتينات لها خواص تركيبية ووظيفية عن طريق انزيمات البلمرة- تتحول الأحماض الأمينية اليسارية الى اليمينية تحت ظروف تصنيع الغذاء وبصفة خاصة تحت تأثير الحرارة والوسط القلوى Amino acid racemization وكذلك بواسطة إنزيمات بعض الكائنات الدقيقة مثل إنزيمات الأكسدة Oxidases، نقل مجموعة الأمين Transaminases، إنزيمات التشابه Racemaces- ويلاحظ أن البروتينات التى تحتوى على أحماض أمينية يمينية تتحلل إنزيميا بسرعة أقل عن البروتينات المحتوية على الأحماض الأمينية اليسارية- كما أن نواتج التحليل المائى للبروتينات اليمينية تقلل من قيمتها الغذائية Nutritional quality وأيضا من سلامة وأمان الطعام Food safety حيث تتكون مركبات غير قابلة للتمثيل الغذائى nonaetaboliza-ble D-, ,D-L, L-D-D وهذه الروابط غير قابلة جزئيا أو كليا للتحلل بإنزيمات

حساب المقياس الكيميائى ومعدل الحمض الأمينى فى عينتين (مسحوق ١ ، ٢ وسائل ١ ، ٢)

التركيبة	هستدين	أيزوليوسين	ليوسين	ليسين	مثيونين + سستئين	فينايل آلانين + سستئين	ثريونين	تربتوفان	فالين	مقياس الحمض الأمينى (٪)
مسحوق (١)	٢,٧٥	٤,٧٧	٨,٠٦	٥,٥٦	٢,٩٦	٩,١٦	٣,٦٨	١,٠٨	٤,٨٣	٦٣
سائل مركز (١)	٢,٧٢	٤,٦٦	٧,٨٩	٥,٢٨	٢,٩٨	٨,٧٣	٣,٧٠	١,٣٢	٤,٧٨	٧١
مسحوق (٢)	٣,٣٩	٤,٤٩	٧,٦١	٥,٣٢	٣,٤٨	٨,٩١	٣,٨٩	١,٤٨	٤,٦٨	٨١
سائل مركز (٢)	٤,٤٥	٤,٦٥	٧,٧٤	٥,٧٠	٣,٢٢	٨,٥١	٣,٦٧	١,٢٠	٤,٨٥	٧٠
لبن الانسان	٢,٦	٤,٦	٦,٣	٦,٦	٤,٢	٧,٢	٤,٣	١,٧	٥,٥	

كمية البروتين	معدل الحمض الأمينى	معدل الحمض الأمينى النسبي
٢,٦٥	١,٦٥	٢,٦٥
٢,٦٥	١,٨٨	٢,٦٥
٣,١٤	٢,٥٤	٣,١٤
٣,٠	٢,١٠	٣,٠

فى حالة التركيبة رقم (١) تم حساب :

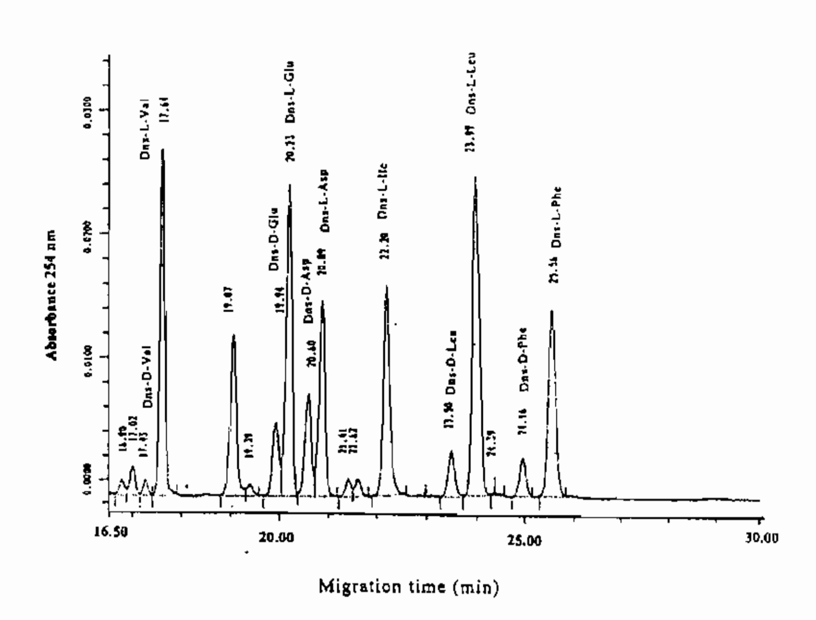
أ- الحمض الأمينى الأقل نقصا بقسمة الحمض الأمينى فى التركيبة (١) على مثيله فى لبن الانسان (البروتين المرجعى) وكانت النسب

١,٠٦ ، ١,٠٤ ، ٠,٨٤ ، ٠,٧ ، ١,٢٧ ، ٠,٨٦ ، ٠,٦٤ ، ٠,٨٨

ب- مقياس الحمض الأمينى = ٠,٦٤ × ١٠٠ = ٦٤

ج- معدل الحمض الأمينى (مقياس الحمض × كمية البروتين) = ٢,٦ × ٠,٦٤ = ١,٧

د- المعدل النسبى = ١,٦٦ ÷ ١,٥ × ١٠٠ = ١١٠,٦٧



فصل متشابهات الأحماض الأمينية بعد تحويلها إلى مشتقات الدانسيل ويلاحظ أن وقت ظهور المتشابه اليمينى أقل من المتشابه اليسارى للحمض الأمينى (Chang et al., 1999).

التحليل المائى للبروتينات العادية ونتيجة لوجود أجهزة HPLC, GC وأعمدة لها القدرة على فصل المتشابهات Chiral columns أمكن فصل المتشابهات اليمينية عن اليسارية للأحماض الأمينية- والكروماتوجرام فى صفحة ١٣٥ يوضح تتابع فصل متشابهات الأحماض الأمينية.

٩-٧- دراسة تأثير المعاملات الصناعية على القيمة الغذائية للبروتين

تؤدى المعاملات التكنولوجية (الحفظ- التخزين- الأضافات الغذائية) الى:-

١- تكسير الأحماض الأمينية الحرة أو المرتبطة (البروتين) وتصبح مركبات غير مناسبة غذائيا (مثل تكسير السستئين والميثيونين).

٢- تكوين جزيئات معقدة لا تمتص فى الأمعاء مثل مركبات ميلارد -Maillard الناتجة من تفاعل الليسين مع السكرات المختزلة.

٣- يحدث تغيير فى نوعية ونمط Pattern الأحماض الأمينية وهذا يظهر عند مقارنة التركيب قبل وبعد المعاملات التالية:-

٣- المعاملة الحرارية مثل (التجفيف والتعقيم).

٤- الخبيز (طحن وتحميص Roasting).

٥- المعاملة بالقلوى لتنقية البروتينات لتحسين خاصية ذوبانها أو تكسير المواد السامة.

٦- التخمر.

٧- إستخدام مواد إضافية مثل الكبريتيت Sulfite وفوق أكسيد الهيدروجين.. الخ.

٩-٨- : الكشف عن غش الأغذية

١) استخدام الأحماض الأمينية الحرة

أ- العصـــائر

تحتوى كل عصائر الفاكهة على نموذج محدد يبين نوعية وتركيز الأحماض الأمينية. وللتأكد من نقاوة ومصدر العصير يجب مقارنة قيم الأحماض الأمينية فى العصير بقيم الأحماض الأمينية القياسية.

ب - منتجـــات اللحــوم

٨- استخدام خليط من الأحماض الأمينية القياسية ومقارنتها بنوعية الأحماض الأمينية فى اللحم معرفة نسبة الجلوتامات المضافة إلى اللحم لتحسين مذاقه.

٩- الكشف عن إضافة لحم الدواجن إلى منتجات اللحوم الحمراء معتمدا على نسبة ثنائى الببتيد dipeptide ratio: أنسرين/ كارنوسين (Anserine / Carnosine)

٢) استخدام الأحماض الأمينية الكلية

أ- فـى الخمور Wines

يظهر من نموذج الأحماض الأمينية بعد التحليل المائى للخمور التى من مصدر موثوق Certified origin نوعية العنب المستخدم من هذا المصدر. ولمعرفة النسبة المئوية لاحتمال وجود خمر من مصدر آخر، فإنه تقارن قيم الأحماض الأمينية النسبية بالأحماض الأمينية المكونة لمصدر خمر قياسى Wine standard.

النسب المئوية لبعض الأحماض الأمينية فى بعض عصائر الفاكهة

الفاكهة	أرجنين	آلانين	برولين	جلوتاميك	اسباراجين	سيرين	أسبارتيك
برتقال	١٩,٤	٤,٦	٣٢,٠	٣,٦	١٣,٧	٥,٩	٩,٧
جريب فروت	١١,٦	٦,٤	١٦,٨	٤,٨	١٧,٦	٨,٨	٢٢,١
ليمون	١,٤	٨,٨	٢٠,٩	٩,٢	١٥,٢	١٥,٥	٢٢,٥
تفاح	–	٣,٧	٠,١	٥,٧	٦٨,٩	٢,٩	١٦,٨
عنب	٣١,٤	١٢,٤	٣١,٤	٥,٣	٢,١	٣,٦	٣,٧
قراسيا	٠,٤	٢,١	٦,١	١,٤	٧٨,٧	١,١	٣,٣
فراولة	١,١	١٥,٤	٠,٨	٧,٩	٥٣,٥	٦,٥	٧,٧
أنانس	٢,٢	١١,٥	٢,٤	٣,٨	٥١,٠	١٤,٥	٨,٩

يظهر هذا الجدول إختلاف واضح فى كمية كل حمض أمينى تبعا لنوعية عصير الفاكهة

نماذج لقيم الأحماض الأمينية فى بعض أصناف الخمور

الحمض الأمينى	Cotes du Rhone	Bordeaux	Bourgogne
حمض أسبارتيك	٤,٧	٣,٢	٥,٠
ثريونين	٢,٧	٢,٠	٣,٨
سيرين	٣,٦	٢,٧	٤,٢
حمض جلوتاميك*	٨,٥	٤,٩	١٠,٨
برولين*	٤٧,٥	٦٤,٣	٢٩,٩
جليسين	٧,٢	٥,٠	٧,٣
آلانين*	٧,٢	٥,٤	١٠,٩
سستئين	١,٨	٠,٩	١,٣
فالين	٢,٤	٢,٠	٢,٩
ميثيونين	٠,٤	٠,٣	٠,٤
أيزوليوسين	١,٥	١,٢	١,٧
ليوسين	٢,٠	١,٨	٢,١
تيروزين	١,٢	٠,٩	١,١
فينايل آلانين	١,٢	٠,٩	١,٣
هستدين	٠,٩	٠,٥	٠,٨
ليسين	٢,٣	١,٧	٢,٢
أرجنين*	٣,١	١,٢	٥,٦

* تدل هذه العلامة على وجود فروق واضحة بين هذه الأنواع من الأحماض الأمينية وأصناف الخمور المذكورة.

تمييز بعض المصادر البروتينية الهامة عن طريق استخدام نسب بعض الأحماض الأمينية

نسب الأحماض الأمينية	نسيج حيوانى	جيلاتين	بلازما الدم	اللبن	كازين	شرش اللبن	بيض	قمح	صويا
أسبارتك / ليسين	١,٢٠٧	١,٥٩٢	١,١٥٣	١,٠٠٦	٠,٩٠٧	١,٢٧٩	١,٤١٩	١,٩١٦	١,٨٤٠
سيرين / ثريونين	١,٠٨٨	١,٧٧٤	١,٠٣١	١,٢١٦	١,٣٤٢	٠,٧٦٧	١,٥٤٧	١,٧٢١	١,٣٤٣
سيرين / ليسين	٠,٦٥١	٠,٩٠٠	٠,٧٧٨	٠,٧٣٠	٠,٧٤٩	٠,٦٤٥	١,٠٥٣	٢,١٣١	٠,٨٥٨
سيرين / أرجنين	٠,٧١٤	٠,٣٧١	١,٠٦٨	١,٥٩٧	١,٤٩٨	١,٨٥٩	١,١٢٣	١,١٠٠	٠,٦٥٩
جلوتاميك / أسبارتيك	١,٤٦٤	١,٧٧١	١,٤٠٤	٢,٦٢١	٣,١٠١	١,٦٤٣	١,٢٩٧	٧,٠١٦	١,٦٠٨
جلوتاميك / آلانين	٢,٣٢٩	١,٠٦٠	٢,٦٦٨	٦,٢١١	٧,١٢٩	٣,٥٩٨	٢,٢٩٧	٩,٦٦٢	٤,٣١٣
جلوتاميك / ليسين	١,٧٤٥	٢,٨١٩	١,٦١٨	٢,٦٣٠	٢,٨١٢	٢,١٠١	١,٨٤١	١٣,٤٤٢	٢,٩٥٧
ليوسين / ليسين	١,١١٧	٠,١٢٩	١,٠٦٤	١,٢٠٠	١,١٨٨	١,٢٣٢	١,١٩١	٢,٨٩٧	١,٢٤٥
تيروزين / فينايل آلانين	٠,٨٨٤	٠,٣٠٩	٠,٩٣٩	١,٠١٤	١,٠٦٧	٠,٩٠١	٠,٧٧٦	٠,٦٨٢	٠,٧٧٥
أرجنين / ليسين	٠,٩١٠	٢,٤٢٥	٠,٧٢٩	٠,٤٥٨	٠,٥٠٠	٠,٣٥٣	٠,٩٣٨	١,٩٣٩	١,٣٠٣
أحماض أمينية حامضية/ أحماض أمينية قاعدية	٠,٥١٨	٠,٢١٢	٠,٥٧٠	٠,٦٨١	٠,٧٣٦	٠,٤٨٤	٠,٦٠٢	٠,٨٧٣	٠,٥٤٩

ب - فى اللحوم ومنتجاتها Meat and meat products

(١) يمكن الكشف عن وجود أنواع من اللحوم الرخيصة الثمن فى اللحم حيث أن وجـــود المركب 1- methylhistidine يدل على الخلط بلحـــوم الدواجن. كما أن وجود 3- methyl Histidine يدل على خلط اللحم بلحم الخنزير كما أن زيادة نسبة الهستيدين الى الأرجنين فى اللحم يدل على وجود لحم الحصان.

(٢) تقدير الكولاجين أو محتوى الأنسجة الضامة Connective tissue content (CTC) بتقدير محتوى الحمض الأمينى هيدروكسى برولين من المعادلة.

$$CTC\ \% = OH\ Pro\% \times 8$$

أو بتقدير محتوى الجليسين

$$CTC\% = gly\ \% - 4.2/\ 23.0 - 4.2 \times 100$$
$$= 5.32 \times gly\ \% - 22.3$$

الكشف عن بروتينات من مصادر غير اللحمية Non meat protein

(١) الاعتماد على نسب أحماض أمينية معينة Amino acid ratio .

(٢) المقارنة باستخدام لحوم قياسية Meat standard .

(٣) تقدير المحتوى البروتينى (Y) الذى يعتمد على محتوى الأحماض الأمينية الكلية (X) باستخدام المعادلة التالية:-

$$Y = 1.014\ X - 0.791$$

أى بمعرفة كمية الأحماض الأمينية الكلية (X) يمكن معرفة المحتوى البروتينى فى العينة (Y).

References

- AOAC, Association Official Methods of Analysis, 15th ed. By Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA (1990).
- Brueckner, H., Wittner, R. and Godel, H.J., J. Chromatogr. 476:73 (1989).
- Chang, H., Tsai, C. and Li, C., Quantification of racemization of amino acids in alkaline-treated duck eggs by micellar capillary electorphoresis. J. Agric & Food Chem.47 (2) :479- 484 (1999).
- Cohen, S.A. and Michaud, D.P., Anal. Biochem. 211:279 (1993).
- Cousin, M.A., Zeidler, C.S and Nelson, P.E.J. Food Sci.: 49: 430 (1984)
- FAO/WHO Ad Hoc Expert committee, Energy and protein Requirements, WHO Technical Report Series; no.522; FAO Nutrition Meetings Report Series; no.52.

  (WHO, Geneva, FAO, Rome, 1973).
- Farag, R. S., Youssef, A.A., Radwan, A.A., Kderaba, AH and Ismail, A.I. Biochemical studies on pepper seeds at different maturity stages and stored for various periods.

  Fette Seifen Anstrichmittel 84 (9) 366-371 (1982).
- Farag, R.S., Fayza, A.Taha and El-Sherbini, N.R.

Chemotaxonomy studies on leaves of Jojoba and Pawpaw plants. Egypt.J.Hort.14(1): 1-8 (1987).

- Farag, R.S., Shaban, OA, Ragab, AA and Abd El-Aziz, NM Chemical evaluation of macadarnia and pritchardia seeds. Grasas Y Aceites 41: 313-319 (1990)
- Gilman, L.B. and Woodward, C., Current Research in protein Chemistry, Academic Press, San Diego (1990).
- Fouques, D. and Landry, J.Analyst 116:529 (1991)
- Godel, H. and Seite, P., Hewlett-Packard Application note No. 12-5091- 0774 (1991).
- Holme, D.J. and Peck, H., Analytical Biochemistry 2ed., Longman Scientific & Technical, John Wiley and Sons, New York (1993)
- HP Amino quant Series II, Operator's Handbook, HP Part No. 01090- 90025 (1990).
- Jones, B. N., Paabo, S. and Stein, S., J. Liq. Chromatogr. 4:565 (1981).
- Lacey, J.M. and Wilmore, D.W., Nutr. Rev. 48:297 (1990)
- Lai, F. and Sheenan, T., Biotechniques 14:642 (1993)
- Leo M.L Nollet (ed). Handbook of Food Analysis, Marcel Dekker, Inc, New York, Basal, Hong Kong (1996).
- Rattenbury, J. M. (ed). Amino Acid Analysis. John Wiley and Sons, New York (1981).
- Snyder, L.R. and Kirkland, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, New York (1979).
- Snyder, L.R., Glajch, J.L. and Kirkland, J.J., Practical HPLC Method Development. John Wiley and Sons, New York (1988).

- Turnell, D.C. and Cooper, J.D.H. Clin Chem. 28:527 (1982).
- Umagat, H., Kucera, P. and Wen, L.F., J.Chromatogr. 241: 324 (1982).
- Wiedmeir, V.T., Porterfield, S.P. and Hendrich, C.E., J. Chromatogr. 231: 410 (1982).

نبذة عن المؤلف

المؤهـــلات العلميـــة:-

- بكالوريوس فى العلوم الزراعية «شعبة الكيمياء الحيوية» (١٩٦٣)- ماجستير فى العلوم الزراعية «كيمياء حيوية» جامعة القاهرة (١٩٦٦)- دكتوراه فى فلسفة العلوم الكيميائية «كيمياء الليبيدات» جامعة لندن (١٩٧٤).

التـــدرج الوظيـــفى:-

- معيد بقسم الكيمياء الحيوية (١٩٦٣- ٦٧)- مدرس (١٩٧٤- ٧٩)- أستاذ مساعد (١٩٧٥- ٨٤)- أستاذ (١٩٨٤)- رئيس قسم الكيمياء الحيوية (١٩٨٨- ١٩٩٤).

الأوسمة والنياشين الحاصل عليها (محلية وأجنبية) :-

جائزة الدولة التشجيعية ووسام العلوم والفنون من الطبقة الأولى عام ١٩٧٨ ثم مرة أخرى عام ١٩٨٤- جائزة القرن العشرين من المركز العالمى للسيرة الذاتية- كامبريدج- انجلترا (١٩٩٧).

مظاهر التقدير الأخرى:-

اختير بصفته الشخصية لاعطاء محاضرات عن الزيوت الطيارة بموسكو مثلا لشركة بارفيكو (١٩٨٧) ومحاضرات عن التحليل الكروماتوجرافى ممثلا لشركة باى يونيكام (١٩٨٩)- رشح من قبل جامعة القاهرة لنيل جائزة الدولة التقديرية (١٩٩١)- رشح أيضا من قبل المعهد الأمريكى للسير الذاتية لجائزة الإنجازات مدى الحياة (١٩٩٧)- أستاذ ومحاضر فى المؤتمر العالمى الخامس عن وقاية الأغذية المحفوظة بفرنسا (١٩٩٠)- رئيس احدى جلسات مؤتمر الألوان بزراعة الإسماعيلية (١٩٩٣)- أسند إليه مراجعة كتابى «تحاليل كيميائية وفيزيائية بمركز التعليم المفتوح بجامعة القاهرة (١٩٩٣) وزيوت الطعام واستخداماتها لمركز الترجمة بجامعة الملك سعود (١٩٩٣)- أستاذ ومحاضر وضيفا متميزا فى مؤتمر الزيوت العطرية الذى نظمته شركة يونج ليفينج

بأمريكا (١٩٩٥)- تم الإستعانة بأجزاء من أبحاثه بنشرها فى بعض الكتب العلمية المتخصصة بأمريكا- اختير عضوا فى: الجمعية الأمريكية للزيوت (١٩٧٨)، الموسوعة القومية التى اصدرتها الهيئة العامة للاستعلامات بمصر (١٩٨٩)، الجمعية الأمريكية لتقدم العلوم (١٩٩٢)، الجمعية الدولية لكيمياء الحبوب بفرنسا (١٩٩٣)، أكاديمية نيويورك للعلوم (١٩٩٤)، مؤسسة ماركوس الأمريكية ضمن شخصيات الموسوعة العالمية «من هم هؤلاء فى العالم» عامى (١٩٩٦، ١٩٩٧)، موسوعة المركز العالمى للسيرة الذاتية بجامعة كامبريدج انجلترا (١٩٩٧)- المعهد الأمريكى للسير الذاتية ABI ضمن شخصيات الموسوعة العلمية للعلماء المتميزين (١٩٩٧) - محكم دولى فى: مجلة كيمياء الأغذية والزراعة العالمية بأمريكا (١٩٩٥)، المجلة العالمية لعلوم الأطعمة والتغذية بانجلترا (١٩٩٧).

اللجان والهيئات التى شارك فيها:-

لجنة التحرير والنشر بالمجلة العلمية بكلية الزراعة جامعة القاهرة (١٩٧٥- ١٩٩٦)- الهيئة المصرية للتوحيد القياسى وجودة الإنتاج- لجنة تقييم أبحاث وترقية أعضاء هيئة التدريس- اختير ضمن الوفد المصرى المشارك فى اللقاء المصرى والفرنسى حول مواصفات زيت الشلجم (١٩٨٧)- الملتقى العلمى حول إنتاج الزيوت بأكاديمية البحث العلمى والتكنولوجيا (١٩٩١)- حلقة عمل عن غش الزيوت والدهون وصحة الإنسان التى أقامتها الجمعية المصرية المركزية لحماية المستهلك بالتعاون مع برنامج الأمم المتحدة للتنمية (١٩٩٧)- عضوا فى اللجنة القومية للكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية بأكاديمية البحث العلمى والتكنولوجيا (١٩٩٧).

أهم المؤتمرات والاجتماعات التى حضرها أو مثل بلاده فيها:-

المؤتمر العلمى الثالث عن أكسدة الليبيدات بفرنسا (١٩٧٣)- ندوة عن اصابة البذور الزيتية بالفطريات بجامعة شمال شرق ويلز- انجلترا (١٩٧٨)- ندوة عن استخدام الفطريات لإنتاج الدهون بجامعة شمال شرق ويلز- إنجلترا (١٩٨٧)- المؤتمر القومى الأول (١٩٨١) والثانى (١٩٨٥) والرابع (١٩٩٢) للكيمياء الحيوية بمصر- المؤتمر الدولى الجديد فى

تكنولوجيا الغذاء لحفظه وتوفيره (١٩٨١)- مؤتمر جامعة البحث الألمانية (١٩٩٢)- أعياد العلم بسوريا الثانى والثلاثون (١٩٩٢) والثالث والثلاثون (١٩٩٣) والرابع والثلاثون (١٩٩٤)- مؤتمر البحث العلمى ودوره فى المحافظة على التنوع البيولوجى فى الوطن العربى بسوريا (١٩٩٥)- مؤتمر اتحاد جامعات دول البحر المتوسط (١٩٩٦)- المؤتمر العالمى التاسع عن السموم الفطرية بإيطاليا (١٩٩٦)- المؤتمر العالمى السابع من حماية الأغذية المصنعة بالصين (١٩٩٨)- الندوة الأولى لسلامة الأغذية بالسعودية (٢٠٠٠)- الندوة الثانية لآفاق البحث العلمى فى العالم العربى بالشارقه دولة الامارات العربية المتحدة (٢٠٠٢).

أهم المؤلفات والأبحاث العلمية المنشورة:-

قام بتأليف ثلاثة كتب وهى «التحليل الكروماتوجرافى» (رقم الإيداع ٧٨١٧/ ١٩٩٠)- «كتاب كيمياء الليبيدات» (رقم الإيداع ٣٥٧٥/ ١٩٩١)- «التحاليل الطبيعية والكيماوية للزيوت والدهون والزيوت العطرية فى المجلات العالمية الأمريكية الأوربية والمصرية. قام بالإشتراك مع بعض أعضاء هيئة التدريس بكلية الزراعة جامعة القاهرة بتأليف كتاب «أساسيات الكيمياء الحيوية. (رقم الإيداع ١١٧٠٠/٩٩).

رقم الإيداع : ٢٠٠٣/١٩٧١٦
ISBN : 977-281-232-0

مطابع الدار الهندسية
تليفون/فاكس : ٥٤٠٢٥٩٨